



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111190015 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201910999202.4

(22) 申请日 2019.10.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111190015 A

(43) 申请公布日 2020.05.22

(73) 专利权人 天津安百胜医疗科技有限公司
地址 301799 天津市武清区武清开发区新
兴路1号4号厂房201室
专利权人 林玮

(72) 发明人 边爱 杨伟 程海 陈晓静
刘亚宁 刘畅 王贻杰

(74) 专利代理机构 北京格旭知识产权代理事务
所(普通合伙) 11443
代理人 雒纯丹

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104237525 A, 2014.12.24
CN 109765382 A, 2019.05.17
CN 107119023 A, 2017.09.01
CN 104360056 A, 2015.02.18
CN 107589266 A, 2018.01.16
US 4921915 A, 1990.05.01

审查员 周洋

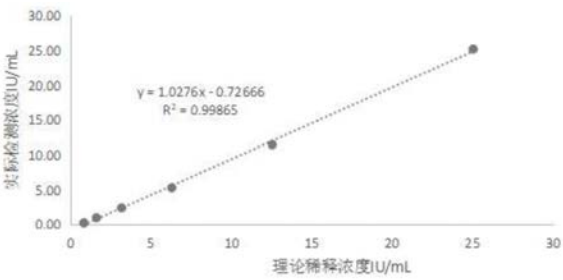
权利要求书2页 说明书31页 附图2页

(54) 发明名称

胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中破伤风
抗体的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中的破伤风抗体含量的试剂盒,所述试剂盒包括试剂R1,试剂R2,破伤风抗体校准品,其中:所述试剂R1包括第一缓冲液;所述试剂R2包括胶乳颗粒、破伤风抗原和第二缓冲液;所述破伤风抗体校准品包括第三缓冲液和浓度不同的一系列破伤风抗体。本发明试剂盒具有准确度高、重复性好、特异性强、灵敏度高、操作简单等优点。



1. 一种胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中的破伤风抗体含量的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括试剂R1, 试剂R2和破伤风抗体校准品,

所述试剂R1包含质量百分比为0.05-0.5%的牛血清白蛋白、质量百分比为0.05-0.1%的PC300、质量百分比为1-10%的氯化钠和pH值为8.5浓度为5-50mmol/L的Tris缓冲液;

所述试剂R2包含第二保护剂、质量百分比为0.05-0.1%的PC300、pH值为6.5-7浓度为5-10mmol/L的MES缓冲液、质量百分比为0.01-0.1%的Tween-20和包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒;

所述第二保护剂选自质量百分比为1-20%的蔗糖或质量合计百分比为1-1.871%的牛血清白蛋白和甘露醇的组合;

所述的试剂R2中的包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径范围为257-350nm,

所述包被破伤风抗原的胶乳颗粒占试剂R2的质量百分比为0.1-0.4%,

所述破伤风抗体校准品包含质量百分比为2-5%的牛血清白蛋白、质量百分比为0.01-0.235%的第三防腐剂、pH值为6.5-7.2浓度为5-10mmol/L的磷酸缓冲液和浓度不同的一系列破伤风抗体;

所述第三防腐剂为PC300、叠氮钠和庆大霉素;

所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒是由活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒和破伤风抗原制备得到的;

所述的包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒的制备方法包括如下步骤:

(1) 聚苯乙烯胶乳颗粒的活化, 将活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒去除杂质;

(2) 破伤风抗原与活化的聚苯乙烯胶乳颗粒的偶联, 加入封闭剂, 得到所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒;

其中, 步骤(1)中利用N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺对聚苯乙烯胶乳颗粒进行活化, 将聚苯乙烯胶乳颗粒在第四缓冲液中混匀, 加入N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺, 混匀, 搅拌活化聚苯乙烯胶乳颗粒,

所述的聚苯乙烯、N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的质量比为(2.08-41.67):(0.58-2.30):(0.19-1.92)。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的聚苯乙烯胶乳颗粒羧基含量为50-300 μ mol/g。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的聚苯乙烯胶乳颗粒羧基含量为69 μ mol/g。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的破伤风抗原为天然破伤风类毒素或重组破伤风抗原。

5. 根据权利要求2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的破伤风抗原为天然破伤风类毒素或重组破伤风抗原。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为25:1-100:1。

7. 根据权利要求2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为25:1-100:1。

8. 根据权利要求4所述的试剂盒, 其特征在于, 所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例

为25:1-100:1。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为48:1。

10. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为48:1。

11. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为48:1。

12. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂R2中的所述第二保护剂为浓度为质量百分比1-10%的蔗糖。

13. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述的破伤风抗体校准品中的所述牛血清白蛋白的浓度为质量百分比5%。

14. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述的破伤风抗体校准品中的所述第三防腐剂的浓度为质量百分比0.2-0.235%。

15. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂R1中氯化钠的浓度为质量百分比1-5.8%。

16. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂R2中的Tween-20的浓度为质量百分比0.02%-0.05%。

17. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述的破伤风抗体校准品中含有5个不同浓度的破伤风抗体。

18. 根据权利要求1-11任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述破伤风抗体的5个不同浓度的取值为0IU/mL、1-5IU/mL、6-10IU/mL、11-20IU/mL、25IU/mL。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒,其特征在于,所述5个不同浓度的破伤风抗体浓度分别为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL和25IU/mL。

20. 权利要求1-19中任意一项所述的试剂盒在检测人血浆中破伤风抗体中的应用。

21. 一种破伤风抗体含量的检测方法,所述破伤风抗体含量的检测方法为利用权利要求1-19中任意一项所述的试剂盒对样品进行检测。

22. 权利要求1-19中任意一项所述的试剂盒在人血浆破伤风抗体效价筛选中的应用。

23. 权利要求21所述的破伤风抗体含量的检测方法在人血浆破伤风抗体效价筛选中的应用。

胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中破伤风抗体的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶乳增强免疫比浊试剂盒,具体而言,本发明涉及一种胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中破伤风抗体的试剂盒。

背景技术

[0002] 破伤风是破伤风梭菌经由皮肤或黏膜伤口侵入人体,在缺氧环境下生长繁殖,产生毒素而引起肌痉挛的一种特异性感染。破伤风毒素主要侵袭神经系统中的运动神经元,因此本病以牙关紧闭、阵发性痉挛、强直性痉挛的为临床特征。潜伏期越短者,预后越差。

[0003] 致病菌破伤风梭菌,为绝对厌氧菌,革兰染色阳性。家畜和人的粪便中均可含菌,随粪便排出体外后,以芽胞状态分布于自然界,尤以土壤中为常见,在土壤中生存数年之久。此菌对环境有很强的抗力,能耐煮沸15~90分钟。破伤风梭菌产生毒性极强的外毒素,即神经痉挛毒素。毒素产生后,并不在局部引起炎症,而是向周围扩散,侵入肌肉组织,并沿着与神经冲动相反的方向,向上传递,最终进入脊髓前角或脑干的运动神经核。

[0004] 破伤风是常和创伤相关联的一种特异性感染。各种类型和大小的创伤都可能受到污染,特别是开放性骨折、含铁锈的伤口、伤口小而深的刺伤、盲管外伤、火器伤,更易受到破伤风梭菌的污染。小儿患者以手脚刺伤多见。若以泥土、香灰、柴灰等土法敷伤口,更易致病。除了可能发生在各种创伤后,还可能发生于不洁条件下分娩的产妇和新生儿、非正规的人工流产术后。中耳炎、压疮、拔牙及宫内放环等均有引起本病的可能。吸毒人员使用不洁注射器静脉注射毒品而患破伤风者亦呈增多趋势。

[0005] 破伤风患者死亡率较高,平均病死率为20%~30%,重症患者高达70%,新生儿及老年人的病死率尤其高。因此对本病的预防和治疗极为重要。

[0006] 破伤风的预防主要依赖抗体,来源于主动免疫和被动免疫。主动免疫通过注射破伤风疫苗在体内产生抗体实现保护。被动免疫通过注射破伤风特异性免疫球蛋白,在体内达到破伤风抗体保护的浓度范围从而实现预防。

[0007] 目前市场上破伤风抗体的检测方法主要有两种:小鼠或豚鼠体内攻毒法,ELISA法。前者属于体内实验,耗时长,需要专门技术人员和场地。后者在实际中应用广泛,虽然是体外检测,检测时间短于小鼠或豚鼠体内攻毒法,操作相对简单,但检测前需要稀释样品,存在批间差板间差较大的问题,造成破伤风抗体效价测值不准,给实际生产带来很大影响。因此,目前急需一种准确度高、重复性好、特异性强、灵敏度高、操作简单的破伤风抗体的检测方法。

发明内容

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供一种破伤风抗体含量检测试剂盒。

[0009] 第一方面,本发明涉及一种胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中的破伤风抗体含量的试剂盒,所述试剂盒包括试剂R1,试剂R2和破伤风抗体校准品,其中:

[0010] 所述试剂R1包括第一缓冲液;

[0011] 所述试剂R2包括胶乳颗粒、破伤风抗原和第二缓冲液；

[0012] 所述破伤风抗体校准品包括第三缓冲液和浓度不同的一系列破伤风抗体。

[0013] 优选地，所述试剂R1还包括选自第一保护剂、第一防腐剂 and 第一电解质中的一种或二种以上物质；更优选地，所述试剂R1包含第一保护剂、第一防腐剂、第一电解质和第一缓冲液。

[0014] 优选地，所述试剂R2还包含选自第二保护剂、第二防腐剂中的一种或二种以上物质；更优选地，所述试剂R2包含第二保护剂、第二防腐剂、第二缓冲液和包被破伤风抗原的胶乳颗粒。

[0015] 优选地，所述破伤风抗体校准品还包含选自第三保护剂、第三防腐剂和第三电解质中的一种或二种以上物质；更优选地，所述破伤风抗体校准品包含第三保护剂、第三防腐剂、第三缓冲液和浓度不同的一系列破伤风抗体；特别优选地，所述破伤风抗体校准品包含第三保护剂、第三防腐剂、第三电解质、第三缓冲液和浓度不同的一系列破伤风抗体。

[0016] 具体地，本发明涉及一种胶乳增强免疫比浊法检测人血浆中的破伤风抗体含量的试剂盒，所述试剂盒包括试剂R1，试剂R2和破伤风抗体校准品，其中：

[0017] 所述试剂R1包含第一保护剂、第一防腐剂、第一电解质和第一缓冲液；

[0018] 所述试剂R2包含第二保护剂、第二防腐剂、第二缓冲液和包被破伤风抗原的胶乳颗粒；

[0019] 所述破伤风抗体校准品包含第三保护剂、第三防腐剂、第三电解质、第三缓冲液和浓度不同的一系列破伤风抗体。

[0020] 优选地，所述的试剂R2中的包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径范围为200-350nm，例如，200nm、210nm、220nm、230nm、240nm、250nm、257nm、260nm、270nm、280nm、290nm、300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm以及上述任意两个数值之间的范围，更优选地，所述的包被破伤风抗原的胶乳颗粒为230nm-300nm。此处应当强调的是，在本申请中上下文中的“257nm”并不是指试剂中的每一个包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径均刚好为257nm，由于胶乳颗粒在制造过程中存在误差，所以257nm规格的包被破伤风抗原的胶乳颗粒是指粒径范围为257nm左右，例如250-270nm范围内，255nm-265nm。微球的粒径与反应度高低和线性范围宽窄息息相关，粒径越大，反应度越高，线性较窄；粒径越小，反应度越低，线性较宽。

[0021] 优选地，所述包被破伤风抗原的胶乳颗粒占试剂R2的质量百分比为0.05-1%，更优选地，所述包被破伤风抗原的胶乳颗粒占试剂R2的质量百分比为0.1%-0.4%，例如，0.1%、0.2%、0.3%、0.4%以及上述任意两个数值之间的范围。所述包被破伤风抗原的胶乳颗粒占试剂R2的质量百分比越低，试剂的本底越低，反应度也越低，反之，则试剂的本底越高，反应度也越高，由于生化仪有一定的检测范围，所以试剂的本底和反应度要达到并且不超过一个范围，本发明所述的R2的质量百分比范围0.05-1%，恰能够达到以上要求，低于这个范围，则反应度过低，高于这个范围，本底过高，反应度也会超过生化仪上限。

[0022] 优选地，所述的试剂R2中的包被破伤风抗原的胶乳颗粒为包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0023] 优选地，所述的聚苯乙烯胶乳颗粒羧基含量为50-300 $\mu\text{mol/g}$ ，例如，50 $\mu\text{mol/g}$ 、60 $\mu\text{mol/g}$ 、70 $\mu\text{mol/g}$ 、80 $\mu\text{mol/g}$ 、90 $\mu\text{mol/g}$ 、100 $\mu\text{mol/g}$ 、110 $\mu\text{mol/g}$ 、120 $\mu\text{mol/g}$ 、130 $\mu\text{mol/g}$ 、140 $\mu\text{mol/g}$ 、150 $\mu\text{mol/g}$ 、160 $\mu\text{mol/g}$ 、170 $\mu\text{mol/g}$ 、180 $\mu\text{mol/g}$ 、190 $\mu\text{mol/g}$ 、200 $\mu\text{mol/g}$ 、210 $\mu\text{mol/g}$ 、

220 $\mu\text{mol/g}$ 、230 $\mu\text{mol/g}$ 、240 $\mu\text{mol/g}$ 、250 $\mu\text{mol/g}$ 、260 $\mu\text{mol/g}$ 、270 $\mu\text{mol/g}$ 、280 $\mu\text{mol/g}$ 、290 $\mu\text{mol/g}$ 、300 $\mu\text{mol/g}$ 以及上述任意两个数值之间的范围,更优选地,所述的聚苯乙烯胶乳颗粒羧基含量为69 $\mu\text{mol/g}$ 。

[0024] 所述的破伤风抗原为天然破伤风类毒素或重组破伤风抗原,优选地,所述的破伤风抗原为重组破伤风类毒素。

[0025] 所述试剂R2中的包被破伤风抗原的胶乳颗粒,胶乳颗粒与破伤风抗原的结合可采用物理吸附法或化学交联法制备,优选地,采用化学交联法将破伤风抗原与胶乳颗粒结合。

[0026] 优选地,所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为25:1-100:1,更优选地,所述胶乳颗粒与破伤风抗原的质量比例为48:1。

[0027] 所述试剂R1、试剂R2和破伤风抗体校准品中的所述第一保护剂、所述第二保护剂或所述第三保护剂各自独立的选自蛋白质、氨基酸、多羟基醇、无机盐、金属络合剂、助悬剂和抗氧化剂中的一种或两种以上的组合。

[0028] 所述的蛋白质选自牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋白中的一种或两种以上的组合。

[0029] 所述的氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸和多聚赖氨酸中的一种或两种以上的组合。

[0030] 所选的多羟基醇选自甘露醇,甘油中的一种或两种以上的组合。

[0031] 所述的无机盐选自氯化钠、氯化钾或氯化镁中的一种或两种以上的组合。

[0032] 所述的金属络合物选自EDTA、EDTP、DTPA中的一种或两种以上的组合。

[0033] 所述的助悬剂选自蔗糖、海藻糖、乳糖中的一种或两种以上的组合。

[0034] 所述的抗氧化剂选自叔丁基对羟基茴香醚和没食子酸丙酯中的一种或两种以上的组合。

[0035] 优选地,所述的试剂R1中的所述第一保护剂的浓度质量百分比为0.01-1%,更优选地为0.05-0.5%。

[0036] 优选地,所述的试剂R2中的所述第二保护剂的浓度质量百分比为1-20%,更优选地为1-10%。

[0037] 优选地,所述的破伤风抗体校准品中的所述第三保护剂的浓度质量百分比为2-5%,更优选地为5%。

[0038] 所述第一保护剂、所述第二保护剂或所述第三保护剂的作用是保护溶液体系中的抗原或者抗体。

[0039] 所述试剂R1、试剂R2和破伤风抗体校准品中的所述第一防腐剂、所述第二防腐剂或所述第三防腐剂各自独立的选自叠氮钠、山梨酸钾、庆大霉素、PC300和亚硝酸钠中的一种或两种以上的组合,优选地,所述试剂R1、试剂R2和破伤风抗体校准品中的所述第一防腐剂、所述第二防腐剂或所述第三防腐剂各自独立的选自叠氮钠、PC300和庆大霉素中的一种或两种以上的组合。

[0040] 优选地,所述的试剂R1中的所述第一防腐剂的浓度为质量百分比0.01-0.5%,更优选地,所述第一防腐剂的浓度为质量百分比0.05-0.1%。

[0041] 优选地,所述的试剂R2中的所述第二防腐剂的浓度为质量百分比0.01-0.5%,更优选地,所述第二防腐剂的浓度为质量百分比0.05-0.1%。

[0042] 优选地,所述的破伤风抗体校准品中的所述第三防腐剂的浓度为质量百分比0.01-1%,更优选地,所述第三防腐剂的浓度为质量百分比0.2-0.5%。

[0043] 防腐剂的主要作用是防止试剂在存放过程中长菌变质,若不加防腐剂,试剂有效期仅为1周。

[0044] 所述试剂R1和破伤风抗体校准品中的所述第一电解质或所述第三电解质各自独立的选自无机盐类中的一种或两种以上的组合,优选地,所述第一电解质、所述第三电解质各自独立的选自一价金属离子无机盐和二价金属离子无机盐中的一种或两种以上的组合,更优选地,所述第一电解质或所述第三电解质各自独立的选自钠离子盐和镁离子盐中的一种或两种以上的组合,特别优选地,所述第一电解质或所述第三电解质各自独立的选自钠离子盐中的一种或两种以上的组合。

[0045] 优选地,所述的试剂R1中的所述第一电解质的浓度为质量百分比1-20%,更优选地,所述第一电解质的浓度为质量百分比1-10%,特别优选地,所述第一电解质的浓度为质量百分比1-5.8%。

[0046] 优选地,所述的破伤风抗体校准品中的所述第三电解质的浓度为质量百分比0.05-1%,更优选地,所述第三电解质的浓度为质量百分比0.5-1%。

[0047] 所述试剂R1、试剂R2和破伤风抗体校准品中的所述第一缓冲液、所述第二缓冲液或所述第三缓冲液各自独立的选自甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、硼酸缓冲液和磷酸缓冲液中的一种或两种以上的组合,优选地,所述第一缓冲液、所述第二缓冲液或所述第三缓冲液选自Tris缓冲液、MES缓冲液和磷酸缓冲液中的一种或两种以上的组合。

[0048] 优选地,所述的试剂R1、试剂R2和破伤风抗体校准品中的所述第一缓冲液、所述第二缓冲液或所述第三缓冲液的浓度各自独立的选自5-100mmol/L,优选地,所述第一缓冲液、所述第二缓冲液或所述第三缓冲液的pH值各自独立的选自6.5-8.5。

[0049] 优选地,所述试剂R2中独立的还含有表面活性剂和反应增强剂中的一种或两种。

[0050] 所述的试剂R2中的表面活性剂选自Tween-20、Tween-60、Tween-80、span-40、span-80和TtitonX-100中的一种或两种以上的组合,优选地,所述的试剂R2中的表面活性剂为Tween-20。

[0051] 所述的试剂R2中的表面活性剂的浓度为质量百分比0.01-1%,更优选地,所述表面活性剂的浓度为质量百分比0.02%-0.05%,例如,0.02%,0.03%,0.04%,0.05%,以及上述任意两个数值之间的范围。

[0052] 所述的试剂R2中的反应增强剂选自聚乙二醇4000、聚乙二醇6000、聚乙二醇8000、聚乙二醇20000和溴化乙二甲胺中的一种或两种以上的组合,优选地,所述的反应增强剂为聚乙二醇6000。

[0053] 所述的试剂R2中的反应增强剂的浓度为质量百分比0.01-10.0%,更优选地,所述的试剂R2中的反应增强剂的浓度为质量百分比0.1%-5.0%。

[0054] 本发明中所述的破伤风抗体校准品包含的浓度不同的一系列破伤风抗体,是指在本发明提供的试剂盒中含有多个不同浓度的破伤风抗体,包括但不限于3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个和10个不同浓度的破伤风抗体。

[0055] 优选地,所述破伤风抗体的浓度分布于0-25IU/mL之间。

[0056] 所述浓度不同的一系列破伤风抗体用于制作标准曲线。

[0057] 优选地,所述的破伤风抗体校准品中系列浓度的破伤风抗体是以校准品稀释液制

备而成的不同浓度的校准品。

[0058] 优选地,所述的破伤风抗体校准品中含有5个不同浓度的破伤风抗体,更优选地,所述破伤风抗体的5个不同浓度的取值为0IU/mL、1-5IU/mL、6-10IU/mL、11-20IU/mL、25IU/mL,特别优选地,所述破伤风抗体的5个不同浓度的取值为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0059] 所述的破伤风抗体校准品中的破伤风抗体来源于人源或马源破伤风免疫球蛋白,优选地,所述的破伤风抗体校准品中使用的破伤风抗体来自人源的破伤风人免疫球蛋白。

[0060] 第二方面,本发明提供所述检测破伤风抗体含量的试剂盒在检测人血浆中破伤风抗体中的应用。

[0061] 第三方面,本发明提供一种破伤风抗体含量的检测方法,所述破伤风抗体含量的检测方法为利用本发明提供的试剂盒对样品进行检测。

[0062] 具体的,所述的破伤风抗体检测方法包括以下步骤:

[0063] 先将样品与试剂R1一起孵育,再加入试剂R2,产生浊度,用生化仪检测浊度,根据标准曲线计算样品对应的抗体浓度值,所述的标准曲线是由5点定标法,以样条函数作为计算模式,绘制得到的。

[0064] 更具体的,所述的破伤风抗体检测方法包括以下步骤:

[0065] 先将样本与试剂R1混匀后孵育5分钟,然后加入试剂R2继续反应5分钟,选取的检测波长为340-800nm,优选地,所述的检测波长为500-700nm,特别优选地,所述的检测波长为546nm,测定反应第5.5分钟和第10分钟时的吸光度值(A1、A2),计算吸光度差值(ΔA),得到反应度,根据标准曲线可计算样本中破伤风抗体的含量。

[0066] 第四方面,本发明还提供所述检测破伤风抗体含量的试剂盒在人血浆破伤风抗体效价筛选中的应用。

[0067] 第五方面,本发明还提供所述的破伤风抗体检测方法在人血浆破伤风抗体效价筛选中的应用。

[0068] 第六方面,本发明还提供一种包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒,所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒是由活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒和破伤风抗原制备得到的。

[0069] 所述的包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

[0070] (1) 聚苯乙烯胶乳颗粒的活化;

[0071] (2) 破伤风抗原与活化的聚苯乙烯胶乳颗粒的偶联,加入封闭剂,得到所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0072] 优选地,步骤(1)中利用N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺对聚苯乙烯胶乳颗粒进行活化,更优选地,将聚苯乙烯胶乳颗粒在第四缓冲液中混匀,加入N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺,混匀,搅拌活化聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0073] 优选地,所述的聚苯乙烯、N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的质量比为(2.08-41.67):(0.58-2.30):(0.19-1.92),更优选地,所述的聚苯乙烯、N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的质量比为(4.16-16.67):(0.93-1.73):(0.19-0.96)。

[0074] 更优选地,所述步骤(1)中取聚苯乙烯胶乳颗粒在第四缓冲液中混匀,使其在活化体系中终浓度为0.416-1.67%。加入N-羟基琥珀酰亚胺混合使终浓度为5-20mM,例如,所述N-羟基琥珀酰亚胺终浓度为5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、

16mM、17mM、18mM、19mM、20mM以及上述任意两个数值之间的范围,优选混匀1-2分钟,再加入碳二亚胺混匀使其终浓度为1-10mM,例如,所述碳二亚胺终浓度为1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM以及上述任意两个数值之间的范围,优选地,所述的混匀时间为1-2分钟,置于搅拌器上进行搅拌,优选地,在室温条件下搅拌20-50分钟,例如,所述搅拌时间为20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟以及上述任意两个数值之间的范围,将活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒去除杂质,优选地,利用脱盐柱或离心法去除杂质。

[0075] 所述第四缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、硼酸缓冲液和磷酸缓冲液中的一种或两种以上的组合。

[0076] 优选地,步骤(2)中破伤风抗原用第五缓冲液稀释后,加入步骤(1)中制备得到的活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒,搅拌3-20h,加入封闭剂,得到所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0077] 更优选地,步骤(2)中将破伤风抗原用第五缓冲液稀释至0.01-0.1mg/mL,置于搅拌器上混匀,优选地,所述的混匀时间为2-10分钟,持续迅速地加入步骤(1)中制备得到的活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒,使微球的质量分数达到0.1-0.4%。

[0078] 优选地,步骤(2)中在室温条件下搅拌3-20h,例如,3h,4h,5h,6h,7h,8h,9h,10h,11h,12h,13h,14h,15h,16h,17h,18h,19h,20h,以及上述任意两个数值之间的范围。

[0079] 优选地,步骤(2)中加入封闭剂进行反应,所述封闭剂的终浓度为35-50 μ L/mL,例如,35 μ L/mL,36 μ L/mL,37 μ L/mL,38 μ L/mL,39 μ L/mL,40 μ L/mL,41 μ L/mL,42 μ L/mL,43 μ L/mL,44 μ L/mL,45 μ L/mL,46 μ L/mL,47 μ L/mL,48 μ L/mL,49 μ L/mL,50 μ L/mL,优选地,所述封闭剂的终浓度为40 μ L/mL,优选地,所述加入封闭剂后的反应时间为0.5-3h,例如,所述反应时间为0.5h,1h,1.5h,2h,2.5h,3h,以及上述任意两个数值之间的范围,更优选地,所述反应时间为1小时。

[0080] 优选地,步骤(2)中,加入封闭剂反应完成之后,还包含在11000rpm-15000rpm条件下离心10-50min去上清,更优选地,在13000rpm条件下离心30min去上清,得到所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0081] 在本发明的一个具体实施方式中,所述包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒经离心去上清后,在超声条件下将包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒分散,具体地,在1%功率条件下,开2秒,停3秒超声1分钟将包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒分散。

[0082] 优选地,所述第五缓冲液选自Tris缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、硼酸缓冲液和磷酸缓冲液中的一种或两种以上的组合。

[0083] 优选地,所述封闭剂选自甘氨酸、牛血清白蛋白中的一种或两种以上的组合,优选地,所述的封闭剂为甘氨酸。

[0084] 本发明所述的用于测定人血浆中的破伤风抗体含量的试剂盒,采用破伤风抗原包被胶乳颗粒的方法,可以与破伤风抗体特异性结合,具有准确度高、重复性好、特异性强、灵敏度高、操作简单等特点,试剂检测可应用于全自动生化仪和透射免疫比浊仪,检测速度快。本发明试剂盒可以快速准确稳定高通量的测试人血浆中0-25IU/mL线性内的破伤风抗体的含量,满足血液制品企业中对于免疫后人血浆中破伤风抗体含量的测定要求。

附图说明

[0085] 图1为包被破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒的粒径与反应度的线性相关系数测试结果图；

[0086] 图2为试剂R1中不同缓冲液与反应度的线性相关系数测定结果图；

[0087] 图3为由实施例5得到的本发明试剂盒与进口试剂盒测定结果的相关性；

[0088] 图4为由实施例5得到的本发明试剂盒线性的测定结果。

具体实施方式

[0089] 本发明中所述的胶乳增强免疫比浊法的反应原理：包被了破伤风抗原的胶乳颗粒可以和样本中的破伤风抗体产生特异性结合，形成抗体-抗原-胶乳颗粒的免疫复合物，在一定波长的光通过时，免疫复合物可吸收一部分光信号，免疫复合物的量和吸收光信号的强度成正比，从而样本中抗体的量与吸收光信号强度成正比，根据校准曲线和样本吸光度，可计算出样本中破伤风抗体的含量。

[0090] 下面通过具体实施例来说明本发明的试剂盒。

[0091] 以下实施例中所用到各试剂来源如下，本文未记载的试剂或仪器或操作步骤均是本领域普通技术人员可常规确定的内容：

[0092] 表1 实施例所用试剂

[0093]

试剂	货号/批号	厂家
重组破伤风类毒素	货号：LK-B040	北京安百胜生物科技有限公司
破伤风抗体	批号：20181006	广东双林生物制药有限公司
Tris	批号：0627C238	AMRESCO Commercial Finance,LLC
PC300	批号：MKCG9444	Sigma-Aldrich, Co.
牛血清白蛋白	批号：2217C301	AMRESCO Commercial Finance,LLC
聚乙二醇 6000	批号：180619	西陇化工股份有限公司
氯化钠	批号：20180122	国药集团化学试剂有限公司
聚苯乙烯胶乳微球	批号：20180419	自制
MES	批号：18I1456502	AMRESCO Commercial Finance,LLC
蔗糖	批号：20171212	国药集团化学试剂有限公司
TWEEN-20	批号：20170606	国药集团化学试剂有限公司
叠氮钠	批号：0969B346	Sigma-Aldrich, Co.
庆大霉素	批号：A1825095	苏州亚科科技股份有限公司
山梨酸钾	货号：69023222	上海沪试实验室器材股份有限公司
甘氨酸	批号：SLBZ9575	Sigma-Aldrich, Co.
海藻糖	货号：63012664	上海沪试实验室器材股份有限公司
氯化镁	货号：10012817	上海沪试实验室器材股份有限公司
标准品 1	产品编号： GBW(E)090276	中国食品药品检定研究院
标准品 2	产品编号： GBW(E)090278	中国食品药品检定研究院
市售破伤风抗体检测试剂盒	型号：ESR108G	广州宜康生物科技有限公司
血红蛋白	产品编号： GBW(E)090011	Sigma-Aldrich, Co.

[0094]

胆红素	货号：B0460	东京仁成工业株式会社
乳糜	批号：80LK077	华瑞制药有限公司

[0095] 实施例1包被破伤风抗原的胶乳颗粒的制备

[0096] 本发明试剂盒所用的聚苯乙烯胶乳颗粒皆是自产,通过无皂乳液(不添加乳化剂或者添加少量乳化剂)的聚合方法,以过硫酸盐(过硫酸钾、过硫酸钠、过硫酸铵等)为引发剂,引发苯乙烯和乙烯基羧酸功能单体(甲基丙烯酸、丙烯酸、马来酸等)共聚制备表面富含羧基的聚苯乙烯微球。通过调整水油比、功能单体配比、反应温度等参数,可以制备粒径

50nm~350nm范围内可调、羧基密度0-400 μ mol/g范围内可控的微球。

[0097] 分别取粒径为180nm、200nm、257nm、350nm、400nm的聚苯乙烯胶乳颗粒溶液各6.47mL,所述聚苯乙烯胶乳颗粒的固含量均为9.28g/100ml溶液(固含量为每100ml聚苯乙烯胶乳颗粒溶液中含有胶乳微球固体的克数),将不同粒径的聚苯乙烯胶乳颗粒均与56.53mL纯化水和7.5mL浓度为500mM、pH值为6.10的MES缓冲液混合均匀备用。

[0098] 用纯化水溶解碳二亚胺至浓度为0.15M,溶解N-羟基琥珀酰亚胺至浓度为0.2M,分别取0.75mL碳二亚胺溶液和3.75mLN-羟基琥珀酰亚胺溶液加入到上述各混合溶液中,混匀,使得碳二亚胺的终浓度为1.5mM、N-羟基琥珀酰亚胺的终浓度为10mM,室温持续搅拌30分钟。

[0099] 取Sephadex G25脱盐柱,用浓度为10mM、pH值为7.2MES缓冲液平衡Sephadex G25脱盐柱,MES缓冲液的用量为2倍柱体积。

[0100] 将上述各活化好的聚苯乙烯胶乳颗粒过Sephadex G25脱盐柱,收取活化液体积1.1倍的洗脱液。

[0101] 分别取4份142.7mL浓度10mM且pH7.2的MES缓冲液,各自均加入32.3mL浓度为0.31mg/mL破伤风抗原,混合均匀,持续快速地分别加入75mL上述各活化后的聚苯乙烯胶乳颗粒,室温搅拌10h。

[0102] 以10mL浓度1M并且pH11.0的甘氨酸溶液封闭,室温搅拌1小时。

[0103] 4℃离心,13000rpm,30分钟,去上清后,以洗液(0.5g/LSDS,0.1MGly缓冲液,pH8.0)复溶重复洗2次,得到所述包被破伤风抗原的胶乳颗粒。

[0104] 实施例2包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径与反应度的线性相关系数测定

[0105] 取实施例1制备得到的粒径为180nm、200nm、257nm、350nm、400nm的包被破伤风抗原的胶乳颗粒,浓度为质量百分比0.19wt%,分别测试校准品5点反应度,并拟合直线。

[0106] 实验结果如图1所示,所述包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径与反应度的线性相关系数均达到0.95以上。但是,180nm粒径条件下反应度明显偏低,且线性相关系数为0.96535,400nm粒径条件下反应度高,但高端反应度上不去,线性相关系数为0.95713,所以,当包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径为180nm和400nm时,不能用于对破伤风抗体的检测。而当包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径为200nm-350nm时,反应度和线性相关系数皆在可用范围内,可用于对破伤风抗体的检测,尤其是当包被破伤风抗原的胶乳颗粒的粒径为257nm时,线性相关系数达到0.99855,且反应度处于较理想水平。

[0107] 实施例3试剂R1中不同缓冲液与反应度的线性相关系数测定

[0108] 选择Tris缓冲液(50mM,pH8.5),磷酸盐缓冲液(50mM,pH7.2)甘氨酸缓冲液(50mM,pH6.5),分别加入1g/LBSA和1M/LNaCl,作为试剂R1进行测试。取粒径为257nm包被破伤风抗原的胶乳颗粒,浓度为质量百分比0.19wt%,测试校准品5点反应度,并拟合直线。

[0109] 实验结果如图2所示,线性相关系数均达到0.98以上,尤其是以Tris缓冲液制备R1溶液,线性相关系数达到0.99855。

[0110] 实施例4一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0111] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒,该试剂盒含有如下所述成分:

[0112] 试剂R1:

[0113] HEPES缓冲液 pH8.5 50mmol/L

- [0114] 试剂R2:
- [0115] MES缓冲液 pH7.0 10mmol/L
- [0116] 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒,胶乳粒径为257nm,羧基密度:69 μ mol/g,胶乳终浓度为0.19wt%。
- [0117] 破伤风抗体校准品:
- [0118] PBS缓冲液 pH7.2 10mmol/L
- [0119] 破伤风抗体使浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。
- [0120] 实施例5一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒
- [0121] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒,该试剂盒含有如下所述成分:
- [0122] 试剂R1:
- | | |
|----------|----------------|
| Tris 缓冲液 | pH8.5 50mmol/L |
| PC300 | 0.05wt% |
| 牛血清白蛋白 | 0.1wt% |
| 氯化钠 | 5.8wt% |
- [0124] 试剂R2:
- | | |
|----------|----------------|
| MES 缓冲液 | pH7.0 10mmol/L |
| 蔗糖 | 10wt% |
| PC300 | 0.05wt% |
| TWEEN-20 | 0.02wt% |
- [0126] 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒,胶乳粒径为257nm,羧基密度:69 μ mol/g,胶乳终浓度为0.19wt%。
- [0127] 破伤风抗体校准品:
- | | |
|---------|----------------|
| PBS 缓冲液 | pH7.2 10mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 5wt% |
| PC300 | 0.1wt% |
| 叠氮钠 | 0.1wt% |
| 庆大霉素 | 0.035wt% |
- [0129] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。
- [0130] 实施例6一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒
- [0131] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒,该试剂盒含有如下所述成分:
- [0132] 试剂R1:
- | | |
|----------|----------------|
| Tris 缓冲液 | pH8.5 50mmol/L |
|----------|----------------|

	PC300	0.05wt%
[0134]	牛血清白蛋白	0.1wt%
	氯化钠	5.8wt%
[0135]	试剂R2:	
	MES 缓冲液	pH6.5 5mmol/L
	牛血清白蛋白	0.05wt%
[0136]	甘露醇	1.821wt%
	PC300	0.1wt%
	TWEEN-20	0.02wt%
[0137]	包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳微球,胶乳粒径为257nm,羧基密度:69 μ mol/g,胶乳浓度为0.19%。	
[0138]	破伤风抗体校准品:	
	PBS 缓冲液	pH7.2 10mmol/L
	牛血清白蛋白	5wt%
[0139]	PC300	0.1wt%
	叠氮钠	0.1wt%
	庆大霉素	0.035wt%
[0140]	破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。	
[0141]	实施例7一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒	
[0142]	一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒,该试剂盒含有如下所述成分:	
[0143]	试剂R1:	
	Tris 缓冲液	pH8.5 50mmol/L
	PC300	0.05wt%
[0144]	牛血清白蛋白	0.1wt%
	氯化钠	5.8wt%
[0145]	试剂R2:	
[0146]	MES 缓冲液	pH7.0 10mmol/L
	蔗糖	10wt%
[0147]	PC300	0.05wt%
	TWEEN-20	0.02wt%
[0148]	包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒,胶乳粒径为257nm,羧基密度:69 μ mol/g,胶乳浓度:0.19wt%。	

[0149] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 2wt%

[0150] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0151] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0152] 实施例8一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0153] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0154] 试剂R1：

Tris 缓冲液 pH8.5 50mmol/L

PC300 0.05wt%

[0155] 牛血清白蛋白 0.05wt%

氯化钠 5.8wt%

[0156] 试剂R2：

MES 缓冲液 pH7.0 10mmol/L

蔗糖 10wt%

[0157] PC300 0.05wt%

TWEEN-20 0.02wt%

[0158] 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒，胶乳粒径为257nm，羧基密度：69 μ mol/g，胶乳浓度：0.19%。

[0159] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0160] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0161] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0162] 实施例9一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0163] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0164] 试剂R1：

- | | | |
|--------|---|----------------|
| | Tris 缓冲液 | pH8.5 50mmol/L |
| [0165] | PC300 | 0.05wt% |
| | 牛血清白蛋白 | 0.5wt% |
| | 氯化钠 | 5.8wt% |
| [0166] | 试剂R2: | |
| | MES 缓冲液 | pH7.0 10mmol/L |
| [0167] | 蔗糖 | 10wt% |
| | PC300 | 0.05wt% |
| | TWEEN-20 | 0.02wt% |
| [0168] | 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒, 胶乳粒径为257nm, 羧基密度:69 μ mol/g, 胶乳浓度:0.19wt%。 | |
| [0169] | 破伤风抗体校准品: | |
| | PBS 缓冲液 | pH7.2 10mmol/L |
| | 牛血清白蛋白 | 5wt% |
| [0170] | PC300 | 0.1wt% |
| | 叠氮钠 | 0.1wt% |
| | 庆大霉素 | 0.035wt% |
| [0171] | 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。 | |
| [0172] | 实施例10一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒 | |
| [0173] | 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒, 该试剂盒含有如下所述成分: | |
| [0174] | 试剂R1: | |
| | Tris 缓冲液 | pH8.5 50mmol/L |
| [0175] | PC300 | 0.05wt% |
| | 牛血清白蛋白 | 0.1wt% |
| | 氯化钠 | 1wt% |
| [0176] | 试剂R2: | |
| | MES 缓冲液 | pH7.0 10mmol/L |
| [0177] | 蔗糖 | 10wt% |
| | PC300 | 0.05wt% |
| | TWEEN-20 | 0.02wt% |
| [0178] | 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒, 胶乳粒径为257nm, 羧基密度:69 μ mol/g, 胶乳浓度:0.19wt%。 | |

[0179] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0180] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0181] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0182] 实施例11一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0183] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0184] 试剂R1：

Tris 缓冲液 pH8.5 50mmol/L

PC300 0.05wt%

[0185] 牛血清白蛋白 0.1wt%

氯化钠 10wt%

[0186] 试剂R2：

MES 缓冲液 pH7.0 10mmol/L

蔗糖 10wt%

[0187] PC300 0.05wt%

TWEEN-20 0.02wt%

[0188] 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒，胶乳粒径为257nm，羧基密度：69 μ mol/g，胶乳浓度：0.19wt%。

[0189] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0190] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0191] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0192] 实施例12一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0193] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0194] 试剂R1：

- | | | |
|--------|--|----------------|
| | Tris 缓冲液 | pH8.5 50mmol/L |
| [0195] | PC300 | 0.05wt% |
| | 牛血清白蛋白 | 0.1wt% |
| | 氯化钠 | 5.8wt% |
| [0196] | 试剂R2: | |
| | MES 缓冲液 | pH7.0 10mmol/L |
| [0197] | 蔗糖 | 1wt% |
| | PC300 | 0.05wt% |
| | TWEEN-20 | 0.02wt% |
| [0198] | 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒,胶乳粒径为257nm,羧基密度:69 μ mol/g,胶乳浓度:0.19wt%。 | |
| [0199] | 破伤风抗体校准品: | |
| | PBS 缓冲液 | pH7.2 10mmol/L |
| | 牛血清白蛋白 | 5wt% |
| [0200] | PC300 | 0.1wt% |
| | 叠氮钠 | 0.1wt% |
| | 庆大霉素 | 0.035wt% |
| [0201] | 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。 | |
| [0202] | 实施例13一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒 | |
| [0203] | 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒,该试剂盒含有如下所述成分: | |
| [0204] | 试剂R1: | |
| | Tris 缓冲液 | pH8.5 50mmol/L |
| [0205] | PC300 | 0.05wt% |
| | 牛血清白蛋白 | 0.1wt% |
| | 氯化钠 | 5.8wt% |
| [0206] | 试剂R2: | |
| | MES 缓冲液 | pH7.0 10mmol/L |
| [0207] | 蔗糖 | 20wt% |
| | PC300 | 0.05wt% |
| | TWEEN-20 | 0.02wt% |
| [0208] | 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒,胶乳粒径为257nm,羧基密度:69 μ mol/g,胶乳浓度:0.19wt%。 | |

[0209] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0210] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0211] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0212] 实施例14一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0213] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0214] 试剂R1：

Tris 缓冲液 pH8.5 50mmol/L

PC300 0.05wt%

[0215] 牛血清白蛋白 0.1wt%

氯化钠 5.8wt%

[0216] 试剂R2：

MES 缓冲液 pH7.0 10mmol/L

蔗糖 10wt%

[0217] PC300 0.05wt%

TWEEN-20 0.01wt%

[0218] 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒，胶乳粒径为257nm，羧基密度：69 μ mol/g，胶乳浓度：0.19wt%。

[0219] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0220] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0221] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0222] 实施例15一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0223] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0224] 试剂R1：

	Tris 缓冲液	pH8.5 50mmol/L
[0225]	PC300	0.05wt%
	牛血清白蛋白	0.1wt%
	氯化钠	5.8wt%
[0226]	试剂R2:	
	MES 缓冲液	pH7.0 10mmol/L
[0227]	蔗糖	10wt%
	PC300	0.05wt%
	TWEEN-20	0.1wt%
[0228]	包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒, 胶乳粒径为257nm, 羧基密度:69 μ mol/g, 胶乳浓度:0.19wt%。	
[0229]	破伤风抗体校准品:	
	PBS 缓冲液	pH7.2 10mmol/L
	牛血清白蛋白	5wt%
[0230]	PC300	0.1wt%
	叠氮钠	0.1wt%
	庆大霉素	0.035wt%
[0231]	破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。	
[0232]	实施例16一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒	
[0233]	一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒, 该试剂盒含有如下所述成分:	
[0234]	试剂R1:	
	Tris 缓冲液	pH8.5 50mmol/L
[0235]	PC300	0.05wt%
	牛血清白蛋白	0.1wt%
	氯化钠	5.8wt%
[0236]	试剂R2:	
	MES 缓冲液	pH7.0 10mmol/L
[0237]	蔗糖	10wt%
	PC300	0.05wt%
	TWEEN-20	0.02wt%
[0238]	包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒, 胶乳粒径为257nm, 羧基密度:69 μ mol/g, 胶乳浓度:0.1wt%。	

[0239] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0240] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0241] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0242] 实施例17一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒

[0243] 一种测定破伤风抗体浓度的试剂盒，该试剂盒含有如下所述成分：

[0244] 试剂R1：

Tris 缓冲液 pH8.5 50mmol/L

PC300 0.05wt%

[0245] 牛血清白蛋白 0.1wt%

氯化钠 5.8wt%

[0246] 试剂R2：

MES 缓冲液 pH7.0 10mmol/L

蔗糖 10wt%

[0247] PC300 0.05wt%

TWEEN-20 0.02wt%

[0248] 包被有破伤风抗原的聚苯乙烯胶乳颗粒，胶乳粒径为257nm，羧基密度：69 μ mol/g，胶乳浓度：0.4wt%。

[0249] 破伤风抗体校准品：

PBS 缓冲液 pH7.2 10mmol/L

牛血清白蛋白 5wt%

[0250] PC300 0.1wt%

叠氮钠 0.1wt%

庆大霉素 0.035wt%

[0251] 破伤风抗体浓度为0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL。

[0252] 实施例18本发明提供试剂盒性能评价

[0253] 一、测试实施例4-17中提供的试剂盒的反应度、线性相关系数、准确度、灵敏度、精密度

[0254] 取5个不同浓度的校准品，测试以上实施例4-17中提供的试剂盒的反应度，并计算线性相关系数、准确度、灵敏度、精密度。并对购自中国食品药品检定研究院的标准品1-GBW

(E) 090276和标准品2-GBW (E) 090278进行测试,标准品1的浓度为4IU/mL,标准品2的浓度为8IU/mL,计算准确度偏差。

[0255] 使用日立7170全自动生化仪,在波长为546nm、温度为37℃条件下对样品进行检测,采用的分析方法为两点终点法,反应方向为上升法,校准方式采用spline校准法。

[0256] 反应度的测试方法为:将240μL试剂R1加入2μL校准品,校准品浓度分别为:0.0IU/mL、3.125IU/mL、6.25IU/mL、12.5IU/mL、25IU/mL,于37℃孵育5min后,加入60μL试剂R2,反应开始30s后读取第一点(A1),反应5min后读取第二点(A2),计算反应度 $\Delta A = A2 - A1$,每管重复测定2次,将各校准品管2次测得的反应度 ΔA 为纵坐标,对应的浓度为横坐标,制作“浓度_反应度”标准曲线。

[0257] 测试结果:

[0258] 1) 实施例4中的试剂盒的性能评价

[0259] 由表2可以看到,实施例4中的试剂盒反应度高点为7186,线性相关系数为0.9963,两个质控品的准确度为1%和14%,精密密度为6.34%和3.54%,可以用于检测待测样本中破伤风抗体的含量。具体数据见表2,表3,表4。

[0260] 表2 实施例4反应度、线性相关、准确度

[0261]

校准品浓度 IU/mL	反应度
0	21.5
3.125	856
6.25	1877.5
12.5	3993.5

[0262]

25	7186
R^2	0.9963
标准品 1 偏差	1%
标准品 2 偏差	14%

[0263] 表3 实施例4灵敏度

[0264]

序号	反应度	序号	反应度
1	0.00	11	0.00
2	0.00	12	0.02
3	0.00	13	0.00
4	0.00	14	0.00
5	0.00	15	0.00
6	0.03	16	0.00

7	0.00	17	0.01
8	0.00	18	0.00
9	0.02	19	0.00
10	0.00	20	0.00
均值	0.00		
SD	0.01		
均值+2*SD	0.02		

[0265] 表4 实施例4精密度

	血浆样本一	血浆样本二
1	3.13	9.55
2	3.02	9.47
3	3.12	9.16
4	3.41	10.11
5	3.21	9.41
6	3.08	9.32
7	2.96	9.22

[0266]

8	2.89	9.34
9	3.13	10.02
10	3.55	9.88
Ave	3.15	9.55
STD	0.20	0.34
CV	6.34%	3.54%

[0267]

[0268] 2) 实施例5-17中的试剂盒的反应度、线性相关、准确度偏差

[0269] 由表5可知,本发明提供的13组实施例中的试剂盒,在利用校准品检测时,高点反应度介于2644-10106之间,尤其是实施例5-15中提供的试剂盒,高点反应度介于3990-5747之间,线性相关都 >0.99 ,标准品偏差都控制在 $\pm 15\%$ 内,所以,本发明提供的试剂盒均可用于对待测样品中的破伤风抗体含量进行检测。其中,实施例10和17标准品偏差较大,实施例10中比实施例5降低了R1缓冲液中的盐浓度,造成质控测值偏差大。实施例16比实施例5降低了微球浓度,导致整体反应度降低,是13组中最低的一组,仅能满足检测的最低要求。实施例17比实施例5增加了R2中微球的浓度,浓度的提高导致本底升高,高点反应度达到生化仪检测上限,整体线性和质控偏差不如其他组。另外,实施例15比实施例5增加了R2中的表面活性剂浓度,导致反应度降低,成为13组中反应度次低的一组。具体比较数据见表5。

[0270] 表5 实施例5-17反应度、线性相关、准确度偏差

[0271]

校准品 浓度 IU/mL	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11
0	-36	-35	-11	-35	-37	15	-64
3.125	531	644	628	580	653	697	546
6.25	1176	1385	1350	1275	1450	1523	1184
12.5	2408	2846	2739	2525	2913	3047	2400
25	4456	5177	5136	4876	5532	5747	4770

[0272]

R ²	0.9977	0.9968	0.9986	0.9993	0.9988	0.9988	0.9999
标准品 1 偏差	-1%	-5%	-5%	-4%	-6%	-10%	0%
标准品 2 偏差	4%	-6%	-7%	-5%	-3%	-5%	-3%
	实施例 12	实施例 13	实施例 14	实施例 15	实施例 16	实施例 17	
0	-18	-4	-33	-31	-27	-17	
3.125	633	636	600	493	403	1305	
6.25	1363	1338	1341	1058	844	2876	
12.5	2804	2712	2639	2052	1543	5956	
25	5216	4983	4870	3990	2644	10106	
R ²	0.9982	0.9977	0.9973	0.9994	0.9892	0.9908	
标准品 1 偏差	-4%	-2%	-4%	0%	-5%	-14%	
标准品 2 偏差	-6%	-4%	-3%	-2%	-6%	13%	

[0273] 3) 测试实施例5、6、7、8、9、11、12、13、14提供的试剂盒的灵敏度、精密度和热稳定性

[0274] 测试实施例5、6、7、8、9、11、12、13、14提供的试剂盒的灵敏度、精密度和37℃7天的热稳定性。灵敏度测试方法为以5%牛血清白蛋白溶液为空白样本,按照所述生化仪测定方法重复测定20次,以空白均值加两倍标准差报告最低检测限,即为灵敏度。精密度测试方法:选取低值样本和高值血浆样本各一例,使用试剂盒对同一份样本连续测定10次,计算试剂盒的检测样本的变异系数。37℃7天的热稳定性通常被用来初步判断试剂的稳定性,它的测定方法:将9组实施例放置于37℃烘箱保存7天后,取出按照所述生化仪测定方法测定2个

浓度点9IU/mL和18IU/mL,每个浓度点各测3次,计算检测值和标示值的相对偏差。结果显示:9组实施例灵敏度结果都符合要求,且水平基本一致;9组实施例精密度结果都符合 $\pm 15\%$ 的最低要求,且高点精密度优于低点,综合2个点的精密度,结果最好的是实施例5,精密度为2.5%和2.4%;9组实施例37℃热稳定性结果都符合 $\pm 15\%$ 的最低要求,偏差最大的是实施例6分别为7.04%、12.07%,偏差最小的为实施例5分别为1.48%、0.56%,可以推测R2试剂中保护剂成分对稳定性有较大影响。具体数据见表6、7、8。

[0275] 表6 9组实施例的灵敏度

灵敏度	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9
1	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
3	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.02	0.03	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
7	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03
10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
13	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
17	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
18	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00

[0277]

19	0.00	0.02	0.01	0.03	0.02
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
均值	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01
SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
均值 +2*SD	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03
	实施例 11	实施例 12	实施例 13	实施例 14	
1	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	0.00	0.07	0.00	0.01	
3	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	0.01	0.00	0.00	0.00	
5	0.00	0.04	0.01	0.00	
6	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	
9	0.02	0.01	0.03	0.04	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	
11	0.00	0.00	0.00	0.00	
12	0.00	0.00	0.00	0.00	
13	0.03	0.00	0.00	0.03	
14	0.00	0.00	0.01	0.00	
15	0.00	0.00	0.00	0.00	
16	0.00	0.02	0.00	0.01	
17	0.00	0.00	0.00	0.00	
18	0.00	0.00	0.00	0.00	
19	0.02	0.02	0.02	0.02	
20	0.00	0.00	0.00	0.00	
均值	0.00	0.01	0.00	0.01	

[0278]

SD	0.01	0.02	0.01	0.01	
均值 +2*SD	0.02	0.04	0.02	0.03	

[0279] 表7 9组实施例的精密度

[0280]

精密度	实施例 5		实施例 6		实施例 7	
	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2
1	3.1	9.4	3.1	9.3	2.7	9.9
2	3.0	9.5	2.9	9.0	2.6	10.0
3	3.2	9.6	3.0	9.1	2.4	10.1
4	3.1	9.9	2.9	8.5	2.6	10.4
5	3.2	9.4	3.0	8.9	2.9	9.9
6	3.0	9.2	2.9	8.7	2.6	9.7
7	3.0	9.2	2.8	8.2	2.5	9.7
8	3.2	9.4	2.6	8.9	2.4	9.9
9	3.0	9.7	3.1	8.4	2.8	10.2
10	3.1	9.8	2.9	8.4	2.6	10.3
均值	3.1	9.5	2.9	8.8	2.6	9.4
STD	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.2
CV	2.5%	2.4%	4.7%	3.7%	5.5%	2.4%
精密度	实施例 8		实施例 9		实施例 11	
	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2
1	2.5	9.3	3.0	9.1	2.5	9.8
2	2.7	9.4	2.9	9.7	2.7	9.4
3	2.3	9.5	3.1	9.2	2.3	9.4
4	2.5	9.6	2.4	9.4	2.5	9.3

[0281]

5	2.8	9.3	3.1	9.6	2.8	9.3
6	2.4	9.1	2.9	9.4	2.5	9.1
7	3.0	8.9	3.1	8.9	3.1	8.9
8	2.5	9.3	3.0	9.6	3.2	9.3
9	2.3	9.6	3.5	9.3	2.6	9.6
10	2.5	9.3	3.0	9.6	2.5	9.7
均值	2.6	9.4	3.0	9.4	2.7	9.4
STD	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
CV	8.2%	3.3%	8.4%	3.1%	10.0%	2.1%
精密度	实施例 12		实施例 13		实施例 14	
	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2
1	2.6	8.9	2.9	8.9	3.0	9.6
2	2.8	9.0	2.8	9.5	2.9	9.2
3	2.4	9.1	3.0	9.6	2.7	9.3
4	2.6	9.2	2.5	9.8	2.9	9.1
5	2.9	8.9	3.0	9.4	3.2	9.1
6	2.5	8.7	2.8	9.2	2.9	8.9
7	2.5	8.8	3.0	9.3	2.8	8.6
8	2.6	8.9	3.0	9.4	2.5	9.1
9	2.3	9.2	3.2	9.7	3.1	9.4
10	2.6	9.3	2.9	9.4	2.9	9.5
均值	2.6	9.0	2.9	9.4	2.9	9.2
STD	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
CV	5.9%	1.9%	6.0%	2.6%	6.1%	3.0%

[0282] 表8 9组实施例的37℃7天稳定性

[0283]

精密度	实施例 5	实施例 6	实施例 7
-----	-------	-------	-------

[0284]

	质控 1	质控 2	质控 1	质控 2	质控 1	质控 2
1	9.3	18.4	8.9	19.1	9.8	19.7
2	9.2	17.4	8.9	19.0	9.5	20.6
3	8.9	18.5	8.6	19.6	9.6	20.2
均值	9.1	18.1	8.8	19.2	9.6	20.2
偏差	1.48%	0.56%	-2.30%	6.89%	7.04%	12.07%
精密度	实施例 8		实施例 9		实施例 11	
	质控 1	质控 2	质控 1	质控 2	质控 1	质控 2
1	9.5	19.4	8.6	17.3	9.0	18.9
2	9.5	20.1	8.5	17.6	9.6	19.2
3	9.6	18.5	8.4	17.0	9.4	19.5
均值	9.5	19.3	8.5	17.3	9.3	19.2
偏差	5.93%	7.41%	-5.56%	-3.89%	3.70%	6.67%
精密度	实施例 12		实施例 13		实施例 14	
	质控 1	质控 2	质控 1	质控 2	质控 1	质控 2
1	8.3	17.4	7.9	17.9	8.9	17.2
2	8.5	17.4	8.3	17.4	8.6	17.1
3	8.9	17.5	8.5	17.6	9.0	17.0
均值	8.6	17.4	8.2	17.6	8.8	17.1
偏差	-4.81%	-3.15%	-8.70%	-2.04%	-1.93%	-4.85%

[0285] 实施例19本发明提供试剂盒性能评价

[0286] 试验材料:实施例5中的试剂盒、市售采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定的进口试剂盒

[0287] 进口试剂盒的试剂组成如下:

[0288] 预包被有破伤风抗原的96孔酶标板

[0289] 酶标二抗、底物、终止液、样本稀释液、校准品、阴性质控品、阳性质控品、浓缩洗液。

[0290] I. 相关性

[0291] 将按照实施例5所配置的本发明试剂盒与市售采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定的进口试剂盒做相关性实验,分别按照本发明的检测方法和市售试剂盒说明书记载的方法检测50份新鲜人血浆(包含阴性和阳性样本),按照各自的说明书测定方法进行测定,对测定值进行相关性分析,结果如图3所示,X,Y轴均为测定值,相关系数 $R^2=0.9258$,回归方程: $y=1.0869x-0.04255$,结果表明本试剂盒与市售试剂盒有良好的相关性,相关性数据如表9所示。

[0292] 表9 本发明试剂盒与市售试剂盒的相关性实验数据表

[0293]

编号	本试剂盒 IU/mL	进口试剂盒 IU/mL	编号	本试剂盒 IU/mL	进口试剂盒 IU/mL
1	1.1	0.9	26	1.0	1.3
2	2.3	2.3	27	3.2	4.0
3	2.3	1.6	28	4.6	6.1
4	1.1	0.8	29	4.1	5.2
5	2.2	1.9	30	3.8	3.6
6	2.3	2.3	31	1.5	1.1
7	2.5	2.1	32	4.2	4.5
8	3.3	1.7	33	1.0	0.8
9	3.8	1.0	34	2.7	3.5
10	8.1	9.9	35	0.6	0.2
11	5.3	3.2	36	3.1	3.5
12	5.0	3.8	37	3.3	4.2
13	15.7	14.7	38	5.0	6.4
14	4.9	7.1	39	2.3	3.2
15	10.2	11.6	40	8.7	9.5
16	17.0	22.5	41	2.2	2.3
17	8.1	6.1	42	2.3	2.6

[0294]

18	20.9	21.5	43	2.3	2.2
19	1.6	1.4	44	13.0	14.2
20	2.7	7.5	45	1.9	1.6
21	2.5	2.7	46	6.5	7.7
22	3.9	5.6	47	3.5	3.9
23	3.1	4.2	48	3.4	3.5
24	7.5	8.3	49	2.1	2.0
25	7.3	8.1	50	13.2	13.4

[0295] II. 线性

[0296] 用破伤风抗体高浓度点以校准品稀释液稀释配置成25IU/mL浓度的点,使用生理盐水按照1/2,1/4,1/8,1/16,1/32的比例进行倍比稀释。共配置成6个浓度点的稀释液,按照试剂盒各自的方法重复测定3次,计算其平均值,将样本的测量值与倍比比例进行相关对比,求出线性回归方程,计算方程的相关系数 r^2 ,线性实验数据如图4所示。结果表明本发明试剂盒线性方程: $y=1.0276x-0.72666$,相关系数 $r^2=0.9987$,本发明试剂盒线性在0.78IU/mL-25IU/mL范围内线性相关良好。

[0297] III. 准确度

[0298] 使用靶值分别为3.125IU/mL (2.5-3.75IU/mL) 和8IU/mL (6.4-9.6IU/mL) 的质控品进行准确度实验,按照试剂盒的测定方法连续测定3次,将检测结果均值与靶值进行测定偏差计算,结果表明本发明试剂盒测低值质控-1.3%,测高值质控4.2%,准确度实验数据如表10所示:

[0299] 表10 本发明试剂盒准确度实验数据表

编号	3.125IU/mL (2.5-3.75IU/mL)	8IU/mL (6.4-9.6IU/mL)
	本试剂盒	本试剂盒
1	3.1	8.0
2	3.2	8.4
3	3.0	8.6
平均值	3.1	8.3
SD	0.1	0.3
偏差	-1.3%	4.2%

[0302] IV. 精密度

[0303] 选取低值样本和高值血浆样本各一例,使用试剂盒对同一份样本连续测定10次,计算试剂盒的检测样本的变异系数,结果表明本发明试剂盒测低值样本精密度2.8%,测高值样本精密度2.4%,精密度实验数据如表11所示:

[0304] 表11 本发明试剂盒精密度实验数据表

	血浆样本一	血浆样本二
1	3.1	9.4
2	3.0	9.5
3	3.2	9.6
4	3.1	9.9
5	3.2	9.4
6	3.0	9.2
7	3.0	9.2

[0314]

序号	批号 1 检测结果 IU/mL	批号 2 检测结果 IU/mL	批号 3 检测结果 IU/mL
1	9.3	9.4	9.5
2	9.2	9.4	9.4
3	9.4	9.2	9.3
批均值	9.3	9.3	9.4
总均值	9.3		
相对偏差	1.2%		

[0315] VII. 干扰实验

[0316] 取浓度为5.1IU/mL的破伤风抗体校准品,分别加入相同体积的各干扰物质溶液,使加入后的各干扰物质浓度达到血红蛋白5g/L,胆红素400 μ mol/L,乳糜3g/L,用本发明试剂盒对每个制备样本重复测定3次,取均值,与加入相同体积的蒸馏水的样本比较,观察加入干扰物质与加入蒸馏水的后的样本的相对偏差,结果显示加入干扰物质的样本与同体积蒸馏水的样本测定值偏差不超过2.0%,当检测样本中存在一定浓度的干扰物质包括血红蛋白、胆红素、和乳糜,对本发明试剂盒影响很小。具体数据如表14。

[0317] 表14 干扰物质对本发明试剂盒的影响实验数据表

[0318]

序号	添加物质			
	蒸馏水	血红蛋白 5g/L	胆红素 400 μ mol/L	乳糜 3g/L
1	5.2	5.0	5.2	5.3
2	5.2	5.2	5.3	5.3
3	5.3	5.3	5.0	5.1
均值	5.2	5.1	5.2	5.2
偏差		-2.0%	0.6%	1.0%

[0319] VIII. 稳定性

[0320] 对本发明试剂盒进行开瓶稳定性和长期稳定性考察。

[0321] 开瓶稳定性:将本发明试剂盒开瓶后放置于2-8 $^{\circ}$ C保存30天后,取出按照所述生化仪测定方法测定2个浓度点9IU/mL和18IU/mL,每个浓度点各测3次,计算检测值和标示值的相对偏差,结果显示,开瓶30天后,本发明试剂盒测定值与标示值的偏差为1.5%,0.6%,显示开瓶稳定性良好。

[0322] 长期稳定性:将本发明试剂盒放置于2-8 $^{\circ}$ C保存12个月后,取出按照所述生化仪测定方法测定2个浓度点9IU/mL和18IU/mL,每个浓度点各测3次,计算检测值和标示值的相对

偏差,结果显示,本发明试剂盒测定值与标示值的偏差为-0.7%,7.2%,显示试剂盒在2-8℃保存是比较稳定的,具体数据见表15。

[0323] 表15 破伤风试剂盒开瓶和长期稳定性实验数据表

[0324]

	开瓶 2-8℃30 天	2-8℃12 个月
--	-------------	-----------

[0325]

序号	9IU/mL	18IU/mL	9IU/mL	18IU/mL
1	9.3	18.4	8.9	19.2
2	9.2	17.4	9.1	19.4
3	8.9	18.5	8.8	19.3
均值	9.1	18.1	8.9	19.3
相对偏差	1.5%	0.6%	-0.7%	7.2%

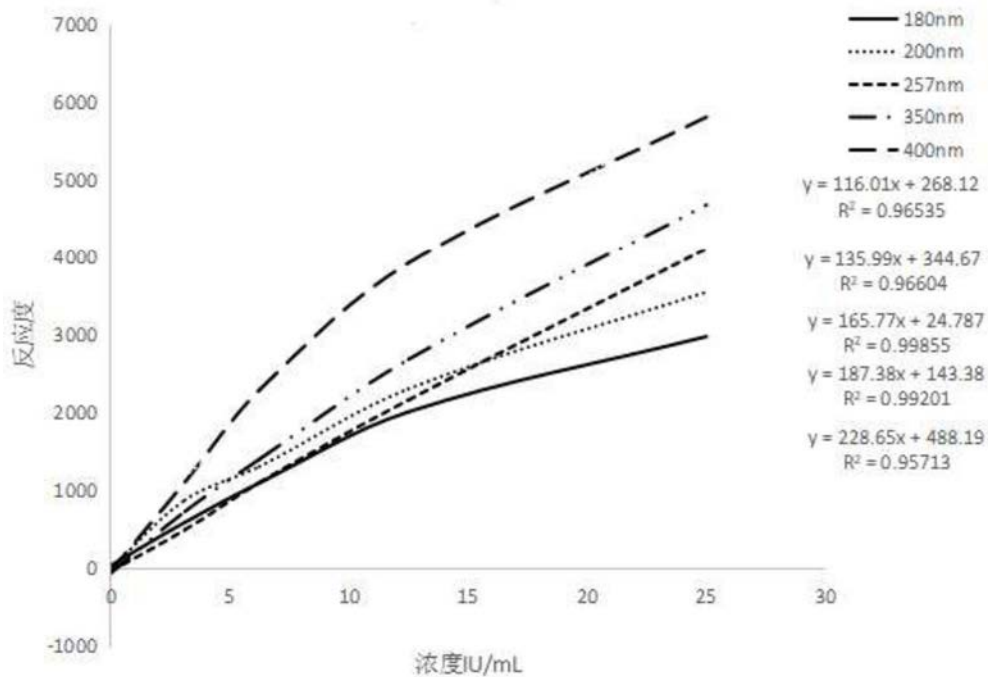


图1

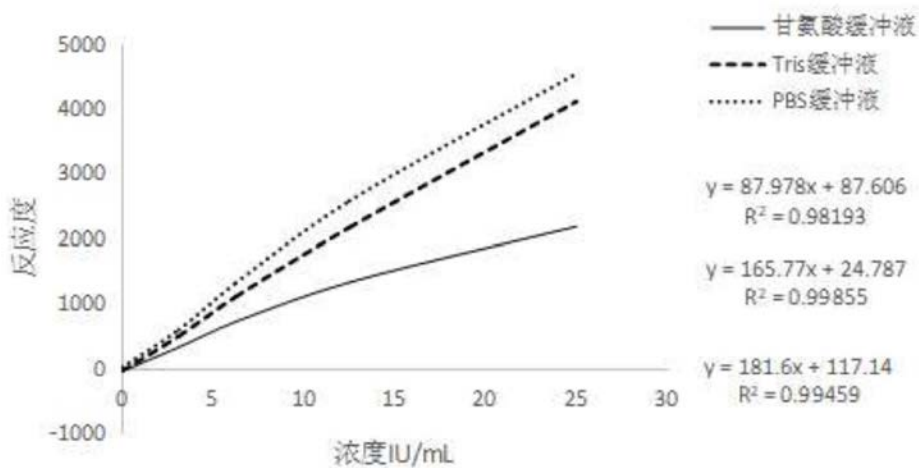


图2

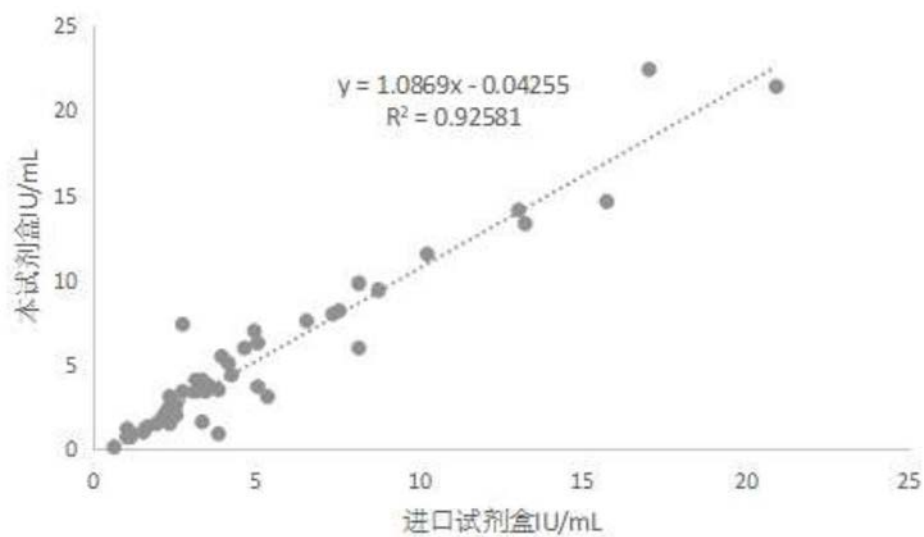


图3

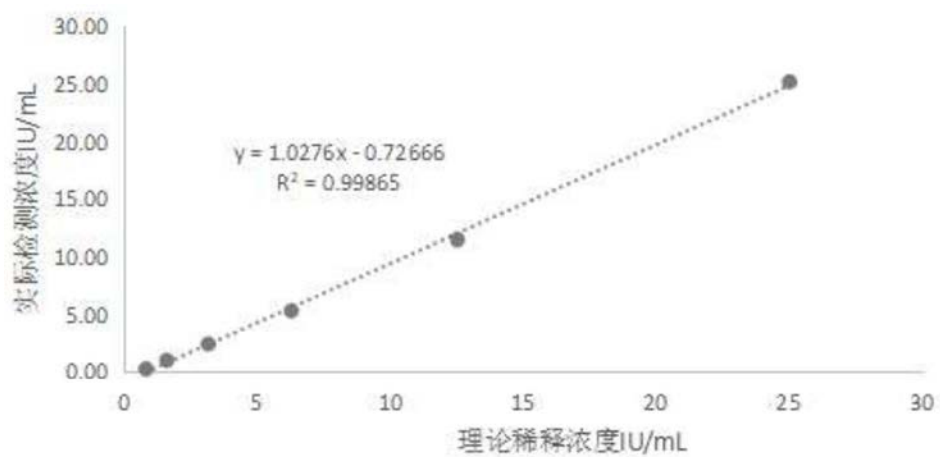


图4