



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802404 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810818030.1

(22)申请日 2018.07.24

(71)申请人 郑州伊美诺生物技术有限公司
地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区第六大街133号1号厂房

(72)发明人 王萍 赵巧辉 李桂林 付光宇
吴学炜

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/72(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

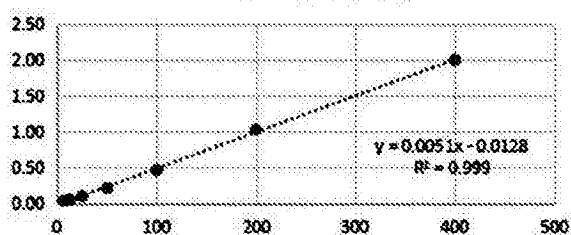
(54)发明名称

牛血清中血红蛋白的定量检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种牛血清中血红蛋白的定量检测方法,首先配制血红蛋白标准品稀释液,用稀释液按梯度0mg/L、5mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L配制系列标准品,1ml/瓶分装后冻干,2~8℃保存;使用时将标准品取出用纯化水复溶;取空白酶标板,设置好加样布局,分别加入20ul梯度标准品或待测样本,再加入酶免底物液50ul、酶免显色液50ul震荡混匀,室温反应10min,在酶标仪波长630或650进行读数;根据标准品检测的发光值和浓度值,绘制标准曲线:以横坐标X轴代表血红蛋白含量,纵坐标Y轴代表酶免读数OD值; $R^2 \geq 0.995$ 时视为最佳线性范围;最后根据待测样品的Y轴读数回算X轴血红蛋白含量,血红蛋白含量 $< 100\text{mg/L}$ 时,符合诊断试剂产品辅料使用需求。本发明提升了试剂盒产品的特异性。

血红蛋白标准曲线



1. 一种牛血清中血红蛋白的定量检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

第一步,血红蛋白标准品稀释液的配制

以每升纯化水计,加入30g的BSA,0.59g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,5.8g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,8.0g的NaCl,0.2g的硫柳汞钠盐,配制成稀释液备用;

第二步,血红蛋白梯度标准品的配制

采用第一步配制的稀释液,按梯度0mg/L、5mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L配制血红蛋白系列标准品;配好后1ml/瓶分装后进行冻干,2~8℃保存;

第三步,加样模式和反应模式

将标准品取出恢复室温,用纯化水按1ml/瓶进行复溶;取空白酶标板,设置好加样布局,分别加入20ul梯度标准品或待测样本,再加入酶免底物液50ul、酶免显色液50ul进行震荡混匀,室温反应10min,在酶标仪波长630或650进行读数;

第四步,实验结果的计算

在Excel表中,根据标准品检测的发光值和浓度值,绘制标准曲线,其中以横坐标X轴代表血红蛋白含量,纵坐标Y轴代表酶免读数OD值; $R^2 \geq 0.995$ 时视为最佳线性范围,根据待测样品的Y轴读数回算X轴血红蛋白含量,血红蛋白含量 $< 100\text{mg/L}$ 时,符合诊断试剂产品辅料使用需求。

2. 根据权利要求1所述的牛血清中血红蛋白的定量检测方法,其特征在于:所述第一步中所用的BSA质检标准为:取20ul浓度3%的牛血清白蛋白加入酶标板,再加入50ul底物和50ul显色剂,室温反应20min,在酶标仪波长630条件下读数 < 0.05 。

3. 根据权利要求1所述的牛血清中血红蛋白的定量检测方法,其特征在于:在第四步实验结果的计算中,当检测OD值 $>$ 标准品梯度200mg/L时的OD值时,用标准品稀释液对样品进行倍比稀释至检测范围内,再进行复测。

牛血清中血红蛋白的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及牛血清中理化指标的检测,尤其是涉及一种牛血清中血红蛋白的定量检测方法。

背景技术

[0002] 新生牛血清作为体外诊断试剂常用的辅料,主要用来进行酶结合物稀释液、标准品稀释液、样本稀释液、质控品稀释液等的配制。

[0003] 国内绝大多数的诊断试剂产品的显色原理均是采用辣根过氧化物酶-H₂O₂-TMB系统,利用辣根过氧化物酶中的铁卟啉环,催化双氧水分解产生氧自由基,进而催化TMB显色。1分子辣根过氧化物酶含有1个铁卟啉环,而1分子血红蛋白含有4个铁卟啉环,同样具有催化-H₂O₂-TMB显色的原理。因此当牛血清中含有较高含量的血红蛋白时,配制的试剂在参与反应的过程中,过多的血红蛋白有吸附到包被板或反应杯上的风险,造成本底升高甚至假阳性。

[0004] 由于牛血清的关键理化指标会影响到试剂盒产品的基本性能,而血红蛋白作为重要的影响因素之一,与试剂盒的本底和特异性息息相关。申请人在前期的研究过程中发现,血红蛋白含量越高,试剂盒的本底越高。血红蛋白主要是采血过程中红细胞破裂释放而来,新生牛的个体差异以及成品的批间差异等,都会造成牛血清中血红蛋白含量的不同。为了筛选符合诊断试剂要求的牛血清辅料,建立一种便捷的血红蛋白检测方法非常重要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种操作简单、适用范围广的牛血清中血红蛋白的定量检测方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的牛血清中血红蛋白的定量检测方法包括以下步骤:

第一步,血红蛋白标准品稀释液的配制

以每升纯化水计,加入30g的BSA,0.59g 的NaH₂PO₄·2H₂O,5.8g的Na₂HPO₄·12H₂O,8.0g的NaCl,0.2g的硫柳汞钠盐,配制成稀释液备用;

第二步,血红蛋白梯度标准品的配制

采用第一步配制的稀释液,按梯度0mg/L、5mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L配制血红蛋白系列标准品;配好后1ml/瓶分装后进行冻干,2~8℃保存;

第三步,加样模式和反应模式

将标准品取出恢复室温,用纯化水按1ml/瓶进行复溶;取空白酶标板,设置好加样布局,分别加入20ul梯度标准品或待测样本,再加入酶免底物液50ul、酶免显色液50ul进行震荡混匀,室温反应10min,在酶标仪波长630或650进行读数;

第四步,实验结果的计算

在Excel表中,根据标准品检测的发光值和浓度值,绘制标准曲线,其中以横坐标X轴代

表血红蛋白含量,纵坐标Y轴代表酶免读数OD值; $R^2 \geq 0.995$ 时视为最佳线性范围,根据待测样品的Y轴读数回算X轴血红蛋白含量,血红蛋白含量 $<100\text{mg/L}$ 时,符合诊断试剂产品辅料使用需求。

[0007] 所述第一步中所用的BSA(牛血清白蛋白)质检标准为:取20u1浓度3%的牛血清白蛋白加入酶标板,再加入50u1底物和50u1显色剂,室温反应20min,在酶标仪波长630条件下读数 <0.05 ,不干扰标准品检测时的读数。

[0008] 在第四步实验结果的计算中,当检测OD值 $>$ 标准品梯度200mg/L时的OD值时,用标准品稀释液对样品进行倍比稀释至检测范围内,再进行复测。

[0009] 本发明的优点在于可提前对采购的牛血清进行血红蛋白定量检测,挑选合格的牛血清用于研发和生产,降低了本底,提升了试剂盒产品的特异性。

[0010] 本发明先筛选出血红蛋白含量符合要求的BSA,然后配制出利于血红蛋白活性稳定性的血红蛋白标准品稀释液,通过酶免定量检测,操作简单,适用范围广,除可用于新生牛血清的血红蛋白检测,也可适用于人血清或其他动物血清及制品的血红蛋白检测。

附图说明

[0011] 图1是本发明血红蛋白标准曲线图。

[0012] 图2为酶标板的加样布局示意图。

具体实施方式

[0013] 下面结合具体实施例和附图对本发明做进一步详细的阐述。

[0014] 本发明所述的牛血清中血红蛋白的定量检测方法包括以下步骤:

第一步,血红蛋白标准品稀释液的配制

由于血红蛋白水溶液不稳定,为保证其稳定性,需配制血红蛋白标准品稀释液:1升纯化水中,加入BSA 30g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.59g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g, NaCl 8.0g, 硫柳汞钠盐 0.2g, 配制成稀释液备用;

其中所用BSA的质检标准为:取20u1浓度3%的BSA加入酶标板,再加入50u1底物和50u1显色剂(采用郑州安图生物工程股份有限公司酶联免疫试剂盒通用底物和显色剂),室温反应20min,在酶标仪波长630条件下读数 <0.05 ,即不干扰标准品检测时的读数。其中BSA不含血红蛋白。

[0015] 第二步,血红蛋白梯度标准品的配制

采用第一步配制的稀释液,按七个梯度0mg/L、5mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L配制血红蛋白系列标准品;配好后1ml/瓶分装后进行冻干,2~8℃保存;

第三步,加样模式和反应模式

将标准品提前取出恢复室温,用纯化水按1ml/瓶进行复溶;取空白酶标板,设置好加样布局(如图2所示),两个空白孔(blank),14个标准品(S0-S6:代表梯度标准品),其余为待测样品孔(P1-P6:代表不同的牛血清样品本),空白或标准品(S)或待测样品(P)均设置复孔;每孔(空白孔只加底物和显色剂)分别加入20u1梯度标准品(S)或待测样本(P),再分别加入酶免底物液50u1、酶免显色液50u1进行震荡混匀,室温反应10min,在酶标仪波长630或650进行读数;

第四步,实验结果的计算

在Excel表中,根据标准品检测的发光值和浓度值,绘制标准曲线,其中以横坐标X轴代表血红蛋白含量,纵坐标Y轴代表酶免读数OD值; $R^2 \geq 0.995$ 时视为最佳线性范围(R^2 指的是方差,表明测量值与拟合得到的公式之间的接近程度,它的值越接近1,表明公式越可靠),根据待测样品的Y轴读数回算X轴血红蛋白含量,血红蛋白含量 $< 100\text{mg/L}$ 时,符合诊断试剂产品辅料使用需求。

[0016] 当检测OD值 $>$ 标准品梯度 200mg/L 时的OD值(超出最高检测线)的样品,用标准品稀释液对样品进行倍比稀释至检测范围内后,再进行复测。

血红蛋白标准曲线

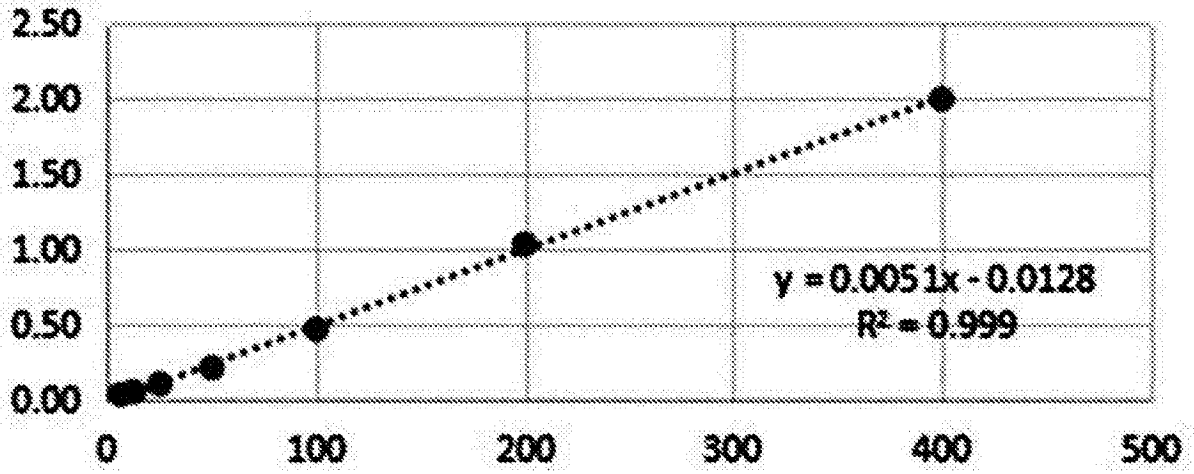


图1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Blank	Blank	P1	P1								
2	S0	S0	P2	P2								
3	S1	S1	P3	P3								
4	S2	S2	P4	P4								
5	S3	S3	P5	P5								
6	S4	S4	P6	P6								
7	S5	S5								
8	S6	S6										

图2