



(21) 申请号 201511001059. 3

(22) 申请日 2015. 12. 28

(71) 申请人 北京九强生物技术股份有限公司

地址 100083 北京市海淀区花园东路 15 号
旷怡大厦 5 层

(72) 发明人 李彦超 高爱民 刘希

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 程云

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/538(2006. 01)

权利要求书3页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒

(57) 摘要

本申请涉及一种用于检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒。更具体而言,本公开的试剂盒包括试剂 1 和试剂 2,其中试剂 1 中含有胰岛素单克隆抗体,试剂 2 中含有包被有胰岛素的胶乳颗粒。单克隆抗体与试剂 2 中胰岛素结合,多个结合物聚集到一起,浊度增大。当加入待测样本时,样本中的胰岛素与试剂 2 中的胰岛素形成竞争,造成浊度降低。通过降低的程度来检测待测样本中胰岛素的含量。本公开的试剂盒灵敏度高,能够检测血清或血浆样本,适用于生化分析仪以便提高检测速度,便于糖尿病的诊断。

1. 一种用于检测胰岛素的胶乳增强免疫透射比浊试剂盒,其包含试剂1、和试剂2,其中:
试剂1含有:胰岛素单克隆抗体、促聚剂、缓冲液;
试剂2含有:包被有胰岛素的胶乳颗粒、多聚物、缓冲液。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中:
包被有胰岛素的胶乳颗粒是通过如下步骤制备的:
在含有交联剂的10-100mM HEPES缓冲液中将胶乳颗粒活化10-30分钟,
加入胰岛素,使其浓度为0.05-0.8mg/ml,
振荡反应1-4小时,优选3小时,使胰岛素包被至胶乳颗粒上,
离心去上清,收获包被有胰岛素的胶乳颗粒;
优选,包被时胶乳颗粒的浓度范围按w/v计为0.2至1.0%;
胶乳颗粒的粒径为100至250nm,优选200nm。
3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中:
试剂1中胰岛素单克隆抗体浓度为0.01-0.2mg/ml,优选0.05-0.15mg/ml,更优选0.08-0.15mg/ml;
胰岛素单克隆抗体选自:兔抗人、鸡抗人、鼠抗人单克隆抗体,胰岛素单克隆抗体优选是鼠抗人单克隆抗体;
包被到胶乳颗粒上的胰岛素选自:猪胰岛素、牛胰岛素、半合成胰岛素、生物合成胰岛素;优选生物合成胰岛素。
4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述的促聚剂选自PEG2000、PEG4000、PEG6000、TWEEN 20、TWEEN 40及其组合,浓度按w/v计为0.5至5%,优选1至2%。
5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中:
采用化学交联法使胰岛素包被至胶乳颗粒上;交联剂为0.1至1mg/ml的EDC和0.1至1mg/ml的S-NHS;胶乳颗粒是羧基修饰的聚苯乙烯颗粒。
6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中:
多聚物选自PEG2000、PEG4000、PEG6000、TWEEN20和TWEEN40及其组合,优选浓度范围按w/v计为1.0-10%。
7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中:
试剂1或试剂2中的缓冲液各自独立地选自MES、Tris、MOPS及其组合,
试剂1的pH范围是5.0-8.0,优选7.0-7.5;
试剂2的pH范围是6.0-8.5,优选6.0-7.0;
优选缓冲液浓度是0.10-0.3mol/L,更优选0.15-0.25mol/L。
8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中:
试剂1或试剂2中还含有防腐剂,所述的防腐剂选自叠氮钠、PC300及其组合,优选浓度按w/v计为0.02-0.5%。
9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其还包括校准品,所述的校准品含有已知浓度的胰岛素,优选至少5个不同浓度的胰岛素;
更优选,校准品包含血清基质、浓度分别为400uIU/ml、150uIU/ml、70uIU/ml、20uIU/ml、10uIU/ml、0uIU/ml的胰岛素以及按w/v计0.01-0.5%的叠氮钠。

10. 一种用于检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒,其含有:
试剂1,其含有:

胰岛素单克隆抗体	0.08mg/ml,
Tris 缓冲液	0.20mol/L, pH=7.5,
Tween 40	按 w/v 计 1.5%,
NaN ₃	按 w/v 计 0.2%;

试剂2,其含有:

Tris缓冲液	0.25mol/L, pH=6.0,
包被有胰岛素的胶乳颗粒200nm,	按w/v计0.45%,其中胰岛素0.35mg/ml,
PEG4000	按w/v计2.0%;

校准品,其含有:

血清基质以及浓度分别为400、150、70、20、10、0uIU/ml的胰岛素;

其中,所述的包被有胰岛素的胶乳颗粒是通过如下步骤制备的:

- 1)在含有交联剂的10-100mM HEPES缓冲液中将胶乳颗粒活化10-30分钟,
- 2)加入胰岛素,使其浓度为0.05-0.8mg/ml,
- 3)振荡反应1-4小时,优选3小时,使胰岛素包被至胶乳颗粒上,
- 4)离心去上清,收获包被有胰岛素的胶乳颗粒;

所述胰岛素单克隆抗体为鼠抗人抗体,效价大于1:30000;

所述胰岛素为生物合成胰岛素。

11. 一种用于检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒,其含有:
试剂1,其含有:

MES 缓冲液	0.15mol/L, pH=7.0,
胰岛素单克隆抗体	0.15mg/ml,
PEG2000	按 w/v 计 1.0%,
NaN ₃	按 w/v 计 0.1%;

试剂2,其含有:

MES缓冲液	0.25mol/L, pH=6.0,
包被有胰岛素的胶乳颗粒250nm	按w/v计0.90%,其中胰岛素的浓度为0.55mg/ml,
TWEEN 20	按w/v计2.0%;

校准品,其含有:

血清基质,胰岛素浓度分别为400、150、70、20、10、0uIU/ml;

其中,包被有胰岛素的胶乳颗粒是通过如下步骤制备的:

- 1)在含有交联剂的10-100mM HEPES缓冲液中将胶乳颗粒活化10-30分钟,
- 2)加入胰岛素,使其浓度为0.05-0.8mg/ml,
- 3)振荡反应1-4小时,优选3小时,使胰岛素包被至胶乳颗粒上,
- 4)离心去上清,收获包被有胰岛素的胶乳颗粒;

所述胰岛素单克隆抗体为鼠抗人抗体,效价大于1:30000;

所述胰岛素为生物合成胰岛素。

12. 一种包被有胰岛素的胶乳颗粒的制备方法,其包括步骤:

1) 在含有0.1至1mg/ml EDC和0.1至1mg/ml S-NHS的10至100mM HEPES缓冲液中将胶乳颗粒活化10至30分钟,

2) 向步骤1)所得的溶液中加入胰岛素,使其浓度为0.05-0.8mg/ml,

3) 振荡反应1至4小时优选3小时,使胰岛素包被至所述胶乳颗粒上,

4) 离心去上清,收获包被有胰岛素的胶乳颗粒,

其中所述的胰岛素单克隆抗体选自:兔抗人、鸡抗人、鼠抗人单克隆抗体;优选胰岛素单克隆抗体是鼠抗人单克隆抗体;

胰岛素选自:猪胰岛素、牛胰岛素、半合成胰岛素、生物合成胰岛素;优选生物合成胰岛素;

所述的胰岛素单克隆抗体效价大于1:30000;

胶乳颗粒的粒径为100nm至250nm,优选200nm,

包被时胶乳颗粒的浓度范围按w/v计为0.2至1.0%。

13. 一种包被有胰岛素的胶乳颗粒,其是通过权利要求12所述的方法制备所得的。

14. 权利要求13所述的包被有胰岛素的胶乳颗粒在制备检测试剂中的用途。

一种用于检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒

技术领域

[0001] 本公开涉及临床检验领域;更具体涉及一种检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒。

背景技术

[0002] 胰岛素是胰岛β细胞分泌的一种激素,由51个氨基酸组成,分子量大约为6000道尔顿,是人体内最主要的降糖激素。胰岛素由A、B两个肽链组成(见图1)。其中A7(Cys)-B7(Cys)、A20(Cys)-B19(Cys)四个半胱氨酸中的巯基形成两个二硫键,使A、B两链连接起来。此外A链中A6(Cys)与A11(Cys)之间也存在一个二硫键。

[0003] 胰岛素对机体各种组织的代谢过程发挥着重要的影响力,是促进机体合成代谢的重要激素,在调节机体糖、脂肪、蛋白质等能量物质代谢上发挥着重要作用:1)安排糖分的贮藏和使用:当血糖浓度升高时,胰岛素分泌增加,加速血液的糖分进入肝脏、肌肉等组织,并以糖原的形式贮藏。当血糖水平下降时,胰岛素分泌减少,可以使储存的糖原重新回到血液里为身体提供能量。2)帮助脂肪的合成和贮存:胰岛素可以促进肝脏合成脂肪酸,使三酰甘油合成增多,极低密度脂蛋白合成增快。它还可以抑制脂解酶的活性,从而抑制脂肪的分解。3)帮助蛋白质的合成:胰岛素可以促使氨基酸进入组织细胞内,使蛋白质合成增加。胰岛素还可抑制蛋白质的分解,使组织细胞释放入血的氨基酸减少。

[0004] 血液胰岛素检查可以判定糖尿病患者是1型患者还是2型患者。主要适合于没有使用胰岛素治疗的患者,可在空腹及餐后2小时抽血进行测定,正常情况下空腹胰岛素水平应该为5-30μIU/ml,而餐后水平应比空腹高出4-5倍。如果患者的胰岛素水平明显降低,就称之为绝对缺乏,可见于1型糖尿病;如果并没有明显减少,而表现为血糖升高,就称为相对缺乏,是因为胰岛素发挥作用的环节出现故障,常见于存在胰岛素抵抗的2型糖尿病患者。

[0005] 目前临床实验室检测胰岛素的方法均采用免疫方法,常用的方法有放射免疫分析法、酶联免疫分析法、发光免疫分析法。

[0006] 免疫学方法是利用蛋白多肽药物抗原决定簇部位的单克隆或多克隆抗体特异地识别被检物,再以放射计数、比色等方法予以定量,即将特异的抗原抗体反应配以灵敏检测的方法。

[0007] a)放射免疫分析法(Immunoradiometric assay, IRMA)的测定原理是:被测物先与固定相上的抗体形成复合物,再与标记(^{125}I)抗体结合,形成夹心复合物。由于两次识别,这就大大增加了方法的特异性,是一种灵敏度高而变异低的测定方法。不足之处在于对标记抗体的纯度要求很高,同时存在放射污染;

[0008] b)酶联免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的原理与IRMA相似,只是第二个抗体不是用放射性同位素标记,而是用可以与底物发生显色反应的酶来标记,根据酶催化反应产物与胰岛素之间量的比例关系来定量胰岛素。与上述两法相比,ELISA具有使用寿命长,重复性好,无辐射源的优点。但是该方法用时较长、准确度和重复性欠佳;

[0009] c)发光免疫分析法(Luminescent immunoassay, LIA)一般可分为荧光、磷光和化学发光三种。利用发光分子作为示踪剂与抗体或抗原偶联,根据发光分子的发光强度测定被测胰岛素含量。不足之处在于:一般发光不稳定,为间断的、闪烁性发光,而且在反应过程中易发生裂变,导致反应结果不稳定;此外。检测时需对结合相、游离相进行分离,操作步骤多,测试成本高。

[0010] 许多研究显示不同检测方法或检测系统在检测灵敏度、特异性和稳定性等方面均存在显著差异。临床上采用这样的胰岛素测定结果进行诊断或治疗,将会带来偏差。造成胰岛素检测结果差异的原因是多方面的,包括免疫技术差异、参考标准试剂差异、患者样本中多种成分的干扰(尤其胰岛素自身抗体等)、以及其它样本的特殊性问题。胰岛素类似物、抗胰岛素抗体和异嗜性抗体等与胰岛素检测抗体的交叉反应在不同的分析方法中差异较大。

[0011] 胶乳增强透射免疫比浊检测(PETIA)技术是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫测定法。该方法先将抗体(或抗原)和胶乳颗粒结合,当抗原(或抗体)与结合了抗体(或抗原)的胶乳颗粒反应时,形成了抗原-抗体-胶乳颗粒(或抗体-抗原-胶乳颗粒)复合物,从而产生浊度,计算标本中抗原(或抗体)的含量。利用生化分析仪进行比浊测定,使得整个分析过程只需几分钟。与上述三种检测方法相比,PETIA兼顾了较高的灵敏度、重复性、相关性、检测速度快等方面的优点,适合门诊急诊检测,值得临床推广应用。

发明内容

[0012] 因此,根据本公开的一些实施方式,提供一种能检测血液样本中的胰岛素试剂盒,具体而言涉及一种检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒。该试剂盒适于检测血液样本,包括血清、血浆、和全血。

[0013] 在一些实施方式中,提供一种检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒,其包括试剂1和试剂2,其中试剂1含有胰岛素单克隆抗体、促聚剂、缓冲液;试剂2含有包被有胰岛素的胶乳颗粒、多聚物、缓冲液。

[0014] 在本公开的一些实施方式中,胰岛素单克隆抗体选自:兔抗人、鸡抗人、鼠抗人单克隆抗体。在一个具体实施方式中,胰岛素单克隆抗体是鼠抗人单克隆抗体。本公开的试剂盒并不限于具体的单克隆株,任何适当的市售胰岛素单克隆抗体、或者按本领域公知方法制备的单克隆抗体均可用于本公开。在一些实施方式中,试剂1中胰岛素单克隆抗体浓度为0.01-0.2mg/ml,优选0.05-0.15mg/ml,更优选0.08-0.15mg/ml。在一个具体实施方式中,试剂1中胰岛素单克隆抗体浓度为0.08mg/ml;在另一个具体实施方式中,试剂1中胰岛素单克隆抗体浓度为0.15mg/ml。

[0015] 在一些实施方式中,试剂2中包被到胶乳颗粒上的胰岛素抗原选自:猪胰岛素、牛胰岛素、半合成胰岛素、生物合成胰岛素。在一个具体实施方式中,是生物合成胰岛素。生物合成胰岛素是指通过生物技术人工合成的胰岛素。任何适当的市售生物合成胰岛素均可用于本公开。

[0016] 在一些实施方式中,试剂2中所述包被有胰岛素的胶乳颗粒是通过如下步骤制备的:

[0017] 在含有0.1至1mg/ml(优选0.5mg/ml)EDAC和0.1至1mg/ml(优选0.5mg/ml)S-NHS的10至100mM(优选30至50mM)HEPES缓冲液(pH 7.2)中,将1%胶乳颗粒(w/v)于37℃活化10-

30分钟(优选20分钟),

[0018] 向上述混合物的溶液中加入胰岛素,使其浓度为0.05-0.8mg/ml,优选0.25至0.5mg/ml,

[0019] 于37℃振荡反应1-4小时,优选3小时,使胰岛素包被至胶乳颗粒上,

[0020] 离心去上清,收获包被有胰岛素的胶乳颗粒。

[0021] 用10-100mM(优选30至50mM)的Tris缓冲液(pH 6.0)重悬包被有胰岛素的胶乳颗粒,冰浴超声30分钟。

[0022] 在一些实施方式中,采用化学交联法使胰岛素包被至胶乳颗粒上。在一些实施方式中,采用交联剂EDC和S-NHS使胰岛素包被至胶乳颗粒上,且胶乳颗粒是羧基修饰的聚苯乙烯颗粒。在一些实施方式中,包被时胶乳颗粒的浓度范围为0.2-1.0%(w/v)。

[0023] 在一些实施方式中,胶乳颗粒的粒径范围为100-250nm。在一个具体实施方式中,胶乳颗粒的粒径为200nm。

[0024] 在一些实施方式中,试剂2中的多聚物选自PEG2000、PEG4000、PEG6000、TWEEN20、TWEEN40及其组合。在一些实施方式中,试剂2中的多聚物浓度范围为1.0-10%(w/v)。在一个具体实施方式中,多聚物浓度范围为1.0-2.0%。

[0025] 在一些实施方式中,试剂1中的促聚剂选自PEG2000、PEG4000、PEG6000、TWEEN20、TWEEN40及其组合;浓度范围为1.0-10%(w/v),优选1.0-2%(w/v)。

[0026] 在一些实施方式中,试剂1和试剂2中的缓冲液可以相同,也可以不同。在一些实施方式中,试剂1和试剂2中的缓冲液独立地选自MES、Tris、MOPS及其组合。在一个具体实施方式中,缓冲液是MES。在另一个具体实施方式中,缓冲液是Tris。在一些实施方式中,缓冲液浓度是0.10-0.3mol/L。在一些实施方式中,缓冲液浓度是0.15-0.25mol/L。在一些实施方式中,试剂1的pH范围是5.0-8.0,优选7.0-7.5;试剂2的pH范围是6.0-8.5,优选6.0-7.0。

[0027] 在一些实施方式中,试剂1或试剂2中还含有防腐剂,选自叠氮钠和PC300的一种或多种。在一些实施方式中防腐剂浓度范围在0.02-0.5%(w/v),0.05至0.15%,优选0.1-0.2%。

[0028] 在一些实施方式中,根据需要,本公开的试剂盒还可以配备有校准品。技术人员理解,校准品通常用于试剂定标。用本申请的试剂盒测量校准品,获得读值并绘制标准曲线。当测量样本时,就可以将样本的读值在这条曲线上找到对应的胰岛素含量。因此,任何市售的适当单项或多项校准品都可用于本公开,也可以自行配制校准品。在一些实施方式中,校准品含有已知浓度的胰岛素。实际上,技术人员知道最少仅需两个点就可以确定一条直线。然而在一些实施方式中,校准品优选涉及至少5个不同的浓度。在一个具体实施方式中,当用于检测血清时,校准品为血清基质,并含有浓度分别为400uIU/ml、150uIU/ml、70uIU/ml、20uIU/ml、10uIU/ml、0uIU/ml的胰岛素以及(w/v)0.01-0.5%的叠氮钠。

[0029] 在一个具体实施方案中,提供一种检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒,其包含试剂1、试剂2和校准品,

[0030] 试剂1包含:

[0031] 0.08mg/ml单克隆抗体,其为鼠抗人抗体,效价大于1:30000,具有高亲和性,

[0032] Tris缓冲液 0.20mol/L pH=7.5,

[0033] Tween 40 1.5%(w/v),

- [0034] NaN_3 0.2% (w/v),
- [0035] 试剂2包含:
- [0036] Tris缓冲液 0.25mol/L pH=6.0,
- [0037] 包被有胰岛素的胶乳颗粒200nm, 0.45% (w/v), 其中胰岛素相当于0.35mg/ml, 其为生物合成胰岛素,
- [0038] PEG4000 2.0% (w/v)
- [0039] 校准品: 血清基质, 浓度分别为400、150、70、20、10、0uIU/ml。
- [0040] 在另一个具体实施方案中, 提供一种检测胰岛素的竞争法胶乳增强免疫透射比浊试剂盒, 其包含试剂1、试剂2和校准品,
- [0041] 试剂1包含:
- [0042] MES缓冲液 0.15mol/L pH=7.0,
- [0043] 单克隆抗体 0.15mg/ml, 其为鼠抗人抗体, 效价大于1:20000, 具有高亲和性,
- [0044] PEG2000 1.0% (w/v),
- [0045] NaN_3 0.1% (w/v),
- [0046] 试剂2包含:
- [0047] MES缓冲液 0.25mol/L pH=6.0,
- [0048] 包被有胰岛素的胶乳颗粒250nm, 0.90% (w/v), 其中胰岛素的浓度为0.55mg/ml, 其为生物合成胰岛素,
- [0049] TWEEN20 2.0% (w/v)
- [0050] 校准品: 血清基质, 浓度分别为400、150、70、20、10、0uIU/ml。
- [0051] 在一些实施方案中, 提供了一种制备包被有胰岛素的胶乳颗粒的方法, 包括步骤:
- [0052] 1) 在含有0.1至1mg/ml (优选0.5mg/ml) EDAC和0.1至1mg/ml (优选0.5mg/ml) S-NHS的10至100mM HEPES缓冲液中将胶乳颗粒于37℃活化10至30分钟,
- [0053] 2) 向步骤1) 所得的溶液中加入胰岛素, 使其浓度为0.05–0.8mg/ml,
- [0054] 3) 于37℃振荡反应1至4小时优选3小时, 使胰岛素包被至所述胶乳颗粒上,
- [0055] 4) 离心去上清, 收获包被有胰岛素的胶乳颗粒。
- [0056] 在一些实施方式中, 所述的胰岛素单克隆抗体选自: 兔抗人、鸡抗人、鼠抗人单克隆抗体; 优选胰岛素单克隆抗体是鼠抗人单克隆抗体。在一些实施方式中, 胰岛素选自: 猪胰岛素、牛胰岛素、半合成胰岛素、生物合成胰岛素; 优选生物合成胰岛素。在一些实施方式中, 所述的胰岛素单克隆抗体效价大于1:30000。在一些实施方式中, 胶乳颗粒的粒径为100nm至250nm, 优选200nm。在一些实施方式中, 包被反应时, 胶乳颗粒的浓度范围按w/v计为0.2至1.0%, 优选1%。
- [0057] 在一些实施方式中, 提供一种包被有胰岛素的胶乳颗粒, 其是通过本公开的方法制备所得的。
- [0058] 在一些实施方式中, 提供本公开的包被有胰岛素的胶乳颗粒在制备检测试剂中的用途。在一些实施方式中, 检测试剂是胶乳增强免疫透射比浊试剂。在一些实施方式中, 检测试剂是用于检测胰岛素的试剂。

附图说明

[0059] 图1:胰岛素结构。

[0060] 图2:本公开胰岛素试剂盒1的定标曲线。

[0061] 图3:本公开胰岛素试剂盒1与国外化学发光试剂盒检测血清测定结果的相关图。横坐标为uIU/ml;纵坐标为吸光度。

[0062] 图4:本公开胰岛素试剂盒1与国外化学发光试剂盒检测血浆测定结果的相关图。横坐标为uIU/ml;纵坐标为吸光度。

具体实施方式

[0063] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本公开,本领域技术人员公知,在不背离本公开精神的情况下,可以对本公开做出许多修改,这样的修改也落入本公开的范围。

[0064] 实施例

[0065] 实施例1:包被有胰岛素的胶乳颗粒的制备方法

[0066] 在含有0.5mg/ml EDAC(购自Merck)和0.5mg/ml S-NHS(购自Merck)的10ml的50mM HEPES缓冲液(pH 7.2)中将1%浓度的胶乳颗粒(粒径200nm或250nm,购自JSR,表面羧基修饰)于37℃活化20分钟,

[0067] 向上述溶液中加入胰岛素(购自Fitzgerald),使其浓度达到0.25mg/ml,

[0068] 在37℃,振荡反应3小时,使胰岛素包被至胶乳颗粒上,

[0069] 离心去上清,收获包被有胰岛素的胶乳颗粒。

[0070] 用50mM的Tris缓冲液(pH 6.0)重悬包被有胰岛素的胶乳颗粒,冰浴超声30分钟后储存备用。

[0071] 实施例2:胰岛素试剂盒1的制备

[0072] 1. 试剂1的制备:

[0073] 按照如下组成配制试剂1:

[0074] 单克隆抗体 0.08mg/ml,鼠抗人,效价>1:30000(购自:Fitzgerald)

[0075] Tris缓冲液 0.20mol/L pH=7.5,

[0076] Tween 40 1.5%(w/v),

[0077] NaN₃ 0.2%(w/v)。

[0078] 2. 试剂2的制备:

[0079] 按照如下组成配制试剂2:

[0080] Tris缓冲液 0.25mol/L, pH=6.0,

[0081] 实施例1所制备的胶乳颗粒 0.45%(w/v)

[0082] PEG4000 2.0%(w/v),

[0083] 3. 校准品的制备:

[0084] 人血清基质,添加胰岛素(购自Fitzgerald)浓度别为400、150、70、20、10、0uIU/ml,以及0.09%(w/v)的叠氮钠。

[0085] 实施例3.胰岛素试剂盒2的制备

[0086] 1. 试剂1的制备:

[0087] 按照如下组成配制试剂1:

[0088] 单克隆抗体 0.15mg/ml,鼠抗人,效价>1:30000(购自:Fitzgerald)

- [0089] MES缓冲液 0.15mol/L,pH=7.0,
- [0090] PEG2000 1.0%(w/v),
- [0091] NaN₃ 0.1%(w/v);
- [0092] 2.试剂2的制备:
- [0093] 按照如下组成配制试剂2:
- [0094] MES缓冲液 0.25mol/L,pH=6.0,
- [0095] 实施例1所制备的胶乳颗粒 0.90%(w/v)
- [0096] TWEEN 20 2.0%(w/v)。
- [0097] 3.校准品的制备:
- [0098] 正常人血清基质,添加胰岛素(购自Fitzgerald)浓度别为400、150、70、20、10、0uIU/ml,以及0.09%(w/v)的叠氮钠。
- [0099] 测试例
- [0100] 测试例1.标准曲线的绘制
- [0101] 试剂盒1采用奥林巴斯AU400定标曲线,结果见图2。
- [0102] 表1:吸光度

[0103]

浓度(uIU/ml)	吸光度A
400	685
150	1500
70	3125
20	5613
10	6872
0	7900

[0104] 测试例2:本申请试剂盒1的灵敏度性能评价

[0105] 仪器:奥林巴斯AU400,化学发光仪。

[0106] 表2:参数设置

[0107]

	参数设置	
样品体积	12 ul	
试剂 1 体积	240 ul	
试剂 2 体积	80 ul	
波长	Pri. 660	Sec. None
方法	终点法	
反应趋势	+	
检测时间	首次 12	末次 27
定标类型	6AB	
拟合方式	spline	
定标测次	2	
样本类型	血清	

[0108] 对照试剂盒:雅培胰岛素检测试剂(化学发光法)

[0109] 检测原理：胰岛素的测定是一种直接化学发光技术和双抗体两点夹心免疫分析法相结合的测定方法。第一抗体称为标识抗体，是由单克隆抗胰岛素抗体标记吖啶酯形成的；第二抗体称为固相化抗体，是由单克隆抗胰岛素抗体以共价键的方式与顺磁性颗粒相结合形成的。血清中的胰岛素与相应抗体发生免疫反应后产生光量子，其光量子数的多少与血清中胰岛素的浓度成正比，经标准曲线即可求得血清胰岛素的浓度水平。

[0110] 检测过程：取血清于样品杯中，置全自动化学发光免疫分析仪上，调整好检测参数：血清25 μ l+第一试剂50 μ l于37℃孵育5min，加第二试剂250 μ l于37℃孵育2.5min，用蒸馏水对反应杯进行分离、抽吸、清洗，最后分别加300 μ l酸试剂和碱试剂到反应系统中进行反应发光，读取光量子数，再根据标准曲线，计算出结果。

[0111] 标准曲线制备：采用两点定标法，将标准血清0.0uIU/ml和138.0uIU/ml安放于仪器的定标位置上，编入测定程序，上机测定自动打印出标准曲线。

[0112] 测试例3：灵敏度评价

[0113] 将浓度合适的血清用去离子水稀释，使某一浓度接近灵敏度限制，每天检测两次，持续10天，记录原始数据，如下表进行计算。

[0114] (1)试剂盒1灵敏度性能评价，结果见表3。

[0115] 表3：试剂盒1灵敏度测值

[0116]

天数	浓度一	浓度二	浓度三
1	1.63	2.27	3.61
2	1.19	2.38	3.49
3	1.42	2.11	3.68
4	1.29	2.24	3.29
5	1.33	2.41	3.56
6	1.54	2.33	3.62
7	1.46	2.24	3.49
8	1.39	2.01	3.67
9	1.55	2.15	3.46
10	1.22	2.03	3.34
均值	1.40	2.22	3.52
SD	0.15	0.14	0.13
CV(%)	10.43	6.28	3.77

[0117] (2)对照试剂盒灵敏度评价，结果见表4。

[0118] 表4：对照试剂盒灵敏度测值

[0119]

天数	浓度一	浓度二	浓度三
1	1.02	2.09	3.72
2	1.21	1.91	3.38
3	1.29	1.89	3.67
4	1.01	2.23	3.41

5	0.95	2.01	3.39
6	1.54	2.11	3.64
7	1.69	2.31	3.51
8	0.93	2.35	3.38
9	1.55	2.46	3.69
10	1.34	2.03	3.26
均值	1.25	2.14	3.51
SD	0.28	0.19	0.16
CV(%)	21.97	8.97	4.65

[0120] 评价标准:日间的CV小于20%

[0121] 结论:本公开的检测胰岛素的检测试剂盒1的灵敏度是1.40uIU/ml,对照试剂盒的灵敏度为2.14uIU/ml,本公开试剂盒1的灵敏度优于对照试剂盒的灵敏度。

[0122] 测试例4.本申请试剂盒1的相关性(血清样本)

[0123] 试剂、校准品、参数均同上;对照试剂为雅培胰岛素检测试剂(化学发光法);样本为血清。

[0124] 表5:检测数据

样本编号	试剂盒 1	对照试剂	样本编号	试剂盒 1	对照试剂
1	26	27	21	31	29
2	17	16	22	22	24
3	15	15	23	27	28
4	24	24	24	16	16
5	38	26	25	28	30
6	5	5	26	7.31	6.54
7	94	92	27	2.04	1.01
8	108	94	28	124	120
9	64	60	29	119	123
10	99	102	30	24	25
11	2	1.51	31	17	18
12	23	24	32	6.58	6.55
13	52	54	33	4.07	4
14	79	79	34	3.51	2.22
15	253	249	35	3.09	1.89
16	366	334	36	1.08	-0.09
17	4.28	4.16	37	2.11	-0.02
18	12	12	38	1.22	-1.23
19	29	27	39	1.05	-0.07
20	31	30	40	0.52	-0.28

[0127] 对所获得的数据进行相关性作图,结果见图3。对照试剂检测2.14uIU/ml以下的血清样本时有时会出现负值;自配试剂与进口试剂的相关系数大于0.99,具有良好的相关性。

[0128] 测试例5:本申请试剂盒1的相关性(血浆样本)

[0129] 试剂、校准品、参数均同上;对照试剂为雅培胰岛素检测试剂(化学发光法);样本

为血浆。

[0130] 表6:检测数据

[0131]

样本编号	试剂盒1	对照试剂	样本编号	试剂盒1	对照试剂
1	31	28	21	33	29
2	17	16	22	22	26
3	2.33	1.56	23	26	24
4	124	120	24	16	14
5	112	121	25	28	31
6	24	22	26	7.31	5.97
7	17	15	27	87	79
8	6.58	6.79	28	54	51
9	24	21	29	19	22
10	31	34	30	10	11
11	5	5	31	5.57	5.01
12	2	1.51	32	54	51
13	38	36	33	21	25
14	67	65	34	2.58	1.25
15	33	32	35	14	13
16	3.25	1.89	36	21	22
17	56	55	37	2.36	1.25
18	24	23	38	1.58	-0.25
19	96	97	39	8.52	8.12
20	28	25	40	9.25	9.25

[0132] 对所获得的数据进行相关性作图,结果见图4。对照试剂检测2.14uIU/ml以下的血浆样本时有时会出现负值;自配试剂与进口试剂的相关系数大于0.99,具有良好的相关性。

[0133] 测试例6:本申请胰岛素试剂盒2的组分及其测试结果

[0134] 将试剂盒2按照上述测试例3-5的方法进行检测,结果表明其在灵敏度、相关性性能方面与试剂盒1均类似。

[0135] 表7:试剂盒2灵敏度测值

[0136]

天数	浓度一	浓度二	浓度三
1	1.23	2.35	3.65
2	1.29	2.28	3.58
3	1.22	2.24	3.68
4	1.18	2.25	3.44
5	1.28	2.44	3.67
6	1.44	2.18	3.49
7	1.52	2.25	3.45

8	1.29	2.18	3.47
9	1.45	2.06	3.58
10	1.32	2.07	3.38
均值	1.32	2.23	3.54
SD	0.11	0.12	0.11
CV(%)	8.45	5.21	3.02

[0137] 表8:血清检测数据

[0138]

样本编号	试剂盒2	对照试剂	样本编号	试剂盒2	对照试剂
1	28	27	21	28	29
2	17	16	22	23	24
3	14	15	23	28	28
4	25	24	24	15	16
5	38	26	25	30	30
6	6	5	26	6.58	6.54
7	93	92	27	2.05	1.01
8	107	94	28	128	120
9	65	60	29	117	123
10	100	102	30	22	25
11	3	1.51	31	18	18
12	22	24	32	6.59	6.55
13	51	54	33	4.02	4
14	78	79	34	3.55	2.22
15	254	249	35	3.07	1.89
16	365	334	36	1.07	-0.09
17	4.17	4.16	37	2.04	-0.02
18	13	12	38	1.05	-1.23
19	27	27	39	1.08	-0.07
20	30	30	40	0.58	-0.28

[0139] 表9:血浆检测数据

[0140]

样本编号	试剂盒2	对照试剂	样本编号	试剂盒2	对照试剂
1	30	28	21	32	29
2	18	16	22	25	26
3	2.45	1.56	23	28	24
4	118	120	24	14	14
5	118	121	25	30	31
6	22	22	26	6.58	5.97
7	15	15	27	78	79

8	6.66	6.79	28	52	51
9	22	21	29	20	22
10	35	34	30	9	11
11	6	5	31	5.65	5.01
12	2.05	1.51	32	52	51
13	35	36	33	22	25
14	68	65	34	2.68	1.25
15	31	32	35	13	13
16	3.58	1.89	36	22	22
17	54	55	37	2.58	1.25
18	23	23	38	1.44	-0.25
19	95	97	39	8.68	8.12
20	25	25	40	9.14	9.25

[0141] 本公开采用竞争免疫反应,由于采用胶乳增强法使单克隆抗体与已经结合到胶乳颗粒上的胰岛素反应形成的结合物体积较大,在特定波长下吸光度能够明显变化。血清或血浆中胰岛素的存在形成竞争,造成包被于胶乳颗粒的胰岛素与单克隆抗体结合减少,特定波长下浊度降低,待测胰岛素的细微变化都能导致吸光度的明显变化。所以本试剂盒的另一显著特点是灵敏度高,能够灵敏的反映出待测血清或血浆胰岛素的含量。

[0142] 市场上有多种免疫透射比浊方法的试剂盒,但是不能应用于生化分析仪,检测时间相对较长,影响检测结果的及时性。本公开采用竞争法胶乳增强免疫透射比浊法,适用于生化分析仪。所以本试剂盒的一个特点是缩短检测时间,提高检测速度。

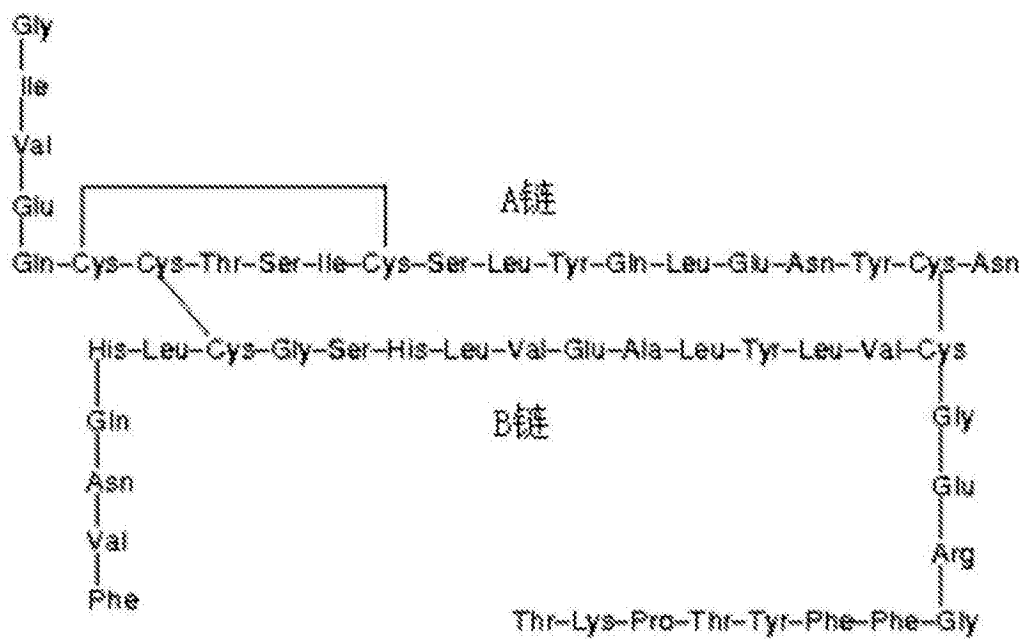


图1

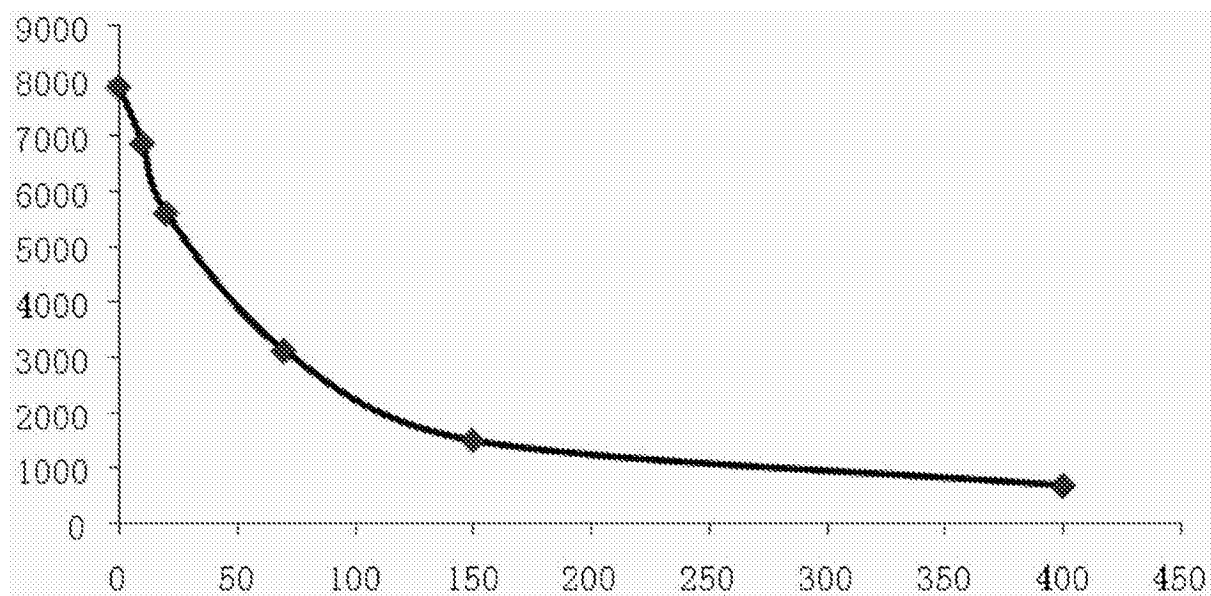


图2

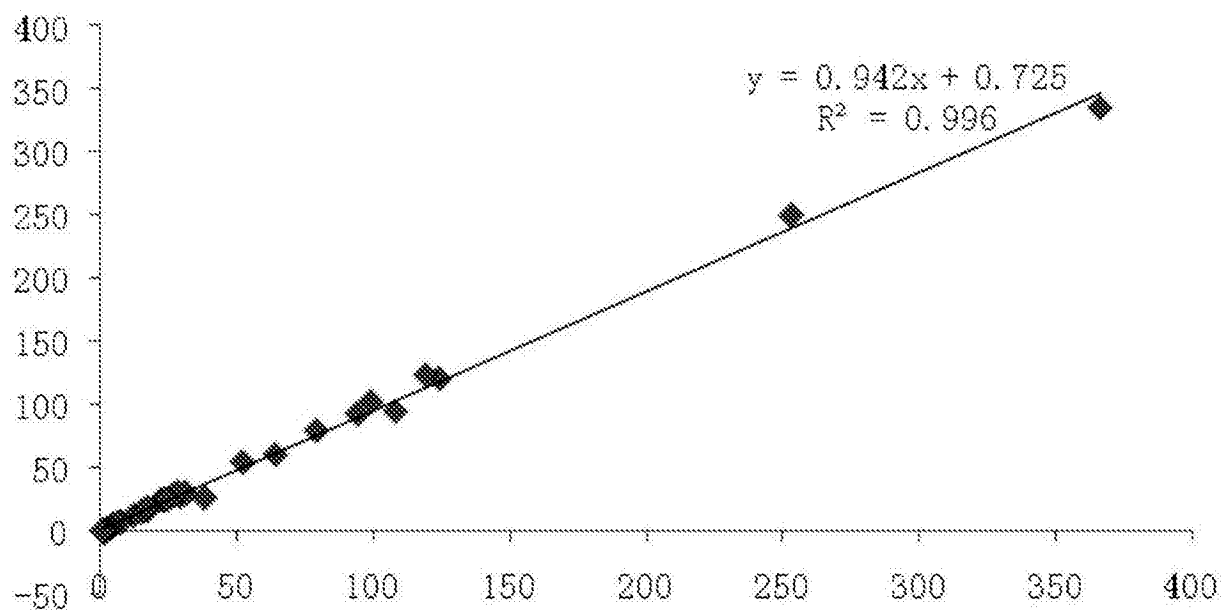


图3

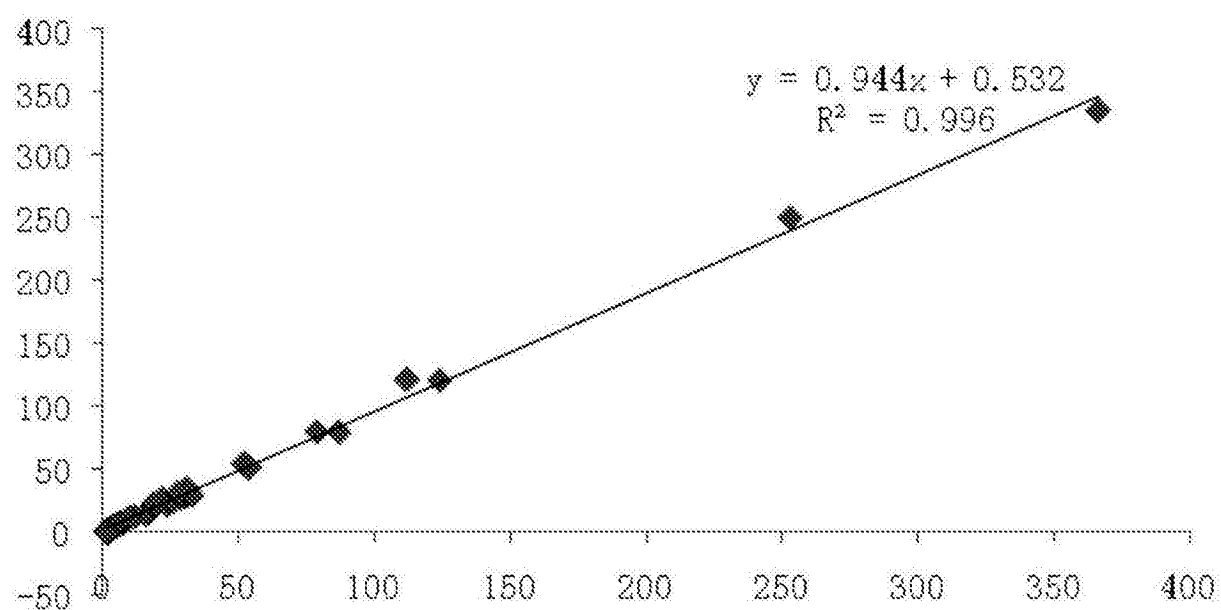


图4