



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110554198 A

(43)申请公布日 2019. 12. 10

(21)申请号 201910879647.9

(22)申请日 2019.09.18

(71)申请人 潍坊市康华生物技术有限公司
地址 261023 山东省潍坊市经济开发区月
河路699号

(72)发明人 田永帅 刘向祎 杨帆 曲林琳
陈利军 杨致亭

(74)专利代理机构 潍坊中润泰专利代理事务所
(普通合伙) 37266

代理人 田友亮

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种肌钙蛋白I检测测试方法

(57)摘要

本发明公开了一种肌钙蛋白I检测测试方法, 本发明优点是吡啶酯属于闪光型标记物, 与激发液混合后, 能够瞬时达到一个极高的发光值, 将吡啶酯标记物标记在cTnI单抗上和Fc结合蛋白上, 通过单抗上的Fc区域与Fc结合蛋白反应, 形成一个cTnI单抗-Fc结合蛋白复合物, 该复合物将有更多的吡啶酯载量, 能够瞬时激发出更高信号的发光值, 实现0.01ng/mL功能灵敏度的测定。

样本	对照试剂	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
临床样本 1	0.000	0.016	0.064	0.054	0.015
临床样本 2	0.000	0.014	0.033	0.021	0.021
临床样本 3	0.000	0.050	0.059	0.060	0.069
临床样本 4	0.000	0.034	0.022	0.056	0.013
临床样本 5	0.000	0.008	0.017	0.058	0.043
临床样本 6	0.000	0.022	0.021	0.030	0.027
临床样本 7	0.000	0.032	0.022	0.026	0.032
临床样本 8	0.000	0.001	0.000	0.018	0.065
临床样本 9	0.029	0.000	0.071	0.025	0.002
临床样本 10	0.036	0.024	0.020	0.017	0.016
临床样本 11	0.041	0.016	0.017	0.002	0.061
临床样本 12	0.044	0.012	0.034	0.001	0.006
临床样本 13	0.045	0.011	0.015	0.010	0.034
临床样本 14	0.061	0.018	0.053	0.006	0.020
临床样本 15	0.063	0.022	0.004	0.000	0.002
临床样本 16	0.065	0.032	0.070	0.036	0.018
临床样本 17	0.070	0.017	0.021	0.005	0.011
临床样本 18	0.096	0.050	0.015	0.005	0.002
临床样本 19	0.099	0.013	0.008	0.012	0.049
临床样本 20	0.099	0.011	0.016	0.006	0.053

1. 一种肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:包括以下步骤:
 - S1、Fc结合蛋白进行吡啶酯标记;
 - S2、cTnI单抗进行吡啶酯标记;
 - S3、Fc结合蛋白与cTnI单抗反应;
 - S4、分离未结合的BSA。
2. 根据权利要求1所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:所述步骤S1,包括以下步骤:
 - A1、取Fc结合蛋白溶解于MES溶液中,充分溶解,配置成0.5-2.0mg/mL的BSA溶液;
 - A2、向A1的产物中加入偶联剂EDC溶液;
 - A3、向A2的产物中加入吡啶酯溶液;
 - A4、向A3的产物中加入甘氨酸溶液;
 - A5、对A4的产物进行超滤,除去未结合的过量的吡啶酯。
3. 根据权利要求2所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:
 - 在步骤A1中,所述Fc结合蛋白的质量为0.5-2.0mg,所述MES溶液的体积为1ml;
 - 在步骤A2中,所述Fc结合蛋白溶液的体积为1ml,所述偶联剂EDC的浓度为10-50mg/mL,所述偶联剂EDC的体积为50-100ul,于25-37℃温度下,反应0.5-1h;
 - 在步骤A3中,所述吡啶酯溶液的浓度为0.5-2.0 mg/mL,所述吡啶酯溶液的体积为50uL,于25-37℃温度下,反应0.5-1h;
 - 在步骤A4中,所述甘氨酸溶液的浓度为5.0-10mg/mL,所述甘氨酸溶液的体积为1mL,于25-37℃温度下,反应20-30min;
 - 在步骤A5中,使用10-30KD超滤管,转速6000-8000rpm,时间15-30min。
4. 根据权利要求1所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:所述步骤S2,包括以下步骤:
 - B1、取cTnI单抗溶解于MES溶液中,充分溶解,配置成0.5-1mg/mL的BSA溶液;
 - B2、向B1的产物中加入偶联剂EDC溶液;
 - B3、向B2的产物中加入吡啶酯溶液;
 - B4、向B3的产物中加入甘氨酸溶液;
 - B5、对B4的产物进行超滤,除去未结合的过量的吡啶酯。
5. 根据权利要求4所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:
 - 在步骤B1中,所述cTnI单抗的质量为0.5-1mg,所述MES溶液的体积为1ml;
 - 在步骤B2中,所述cTnI单抗溶液的体积为1ml,所述偶联剂EDC的浓度为10-50mg/mL,所述偶联剂EDC的体积为50-100ul,于25-37℃温度下,反应0.5-1h;
 - 在步骤B3中,所述吡啶酯溶液的浓度为0.5-1mg/mL,所述吡啶酯溶液的体积为50uL,于25-37℃温度下,反应0.5-1h;
 - 在步骤B4中,所述甘氨酸溶液的浓度为5.0-10mg/mL,所述甘氨酸溶液的体积为1mL,于25-37℃温度下,反应20-30min;
 - 在步骤B5中,使用10-30KD超滤管,转速6000-8000rpm,时间15-30min。
6. 根据权利要求1所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:所述步骤S3,包括以下步骤:

C1、将吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白进行混合、反应。

7. 根据权利要求6所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:

在步骤C1中,吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白的摩尔比为1:1~1:5,于25-37°C温度下,反应20-30min。

8. 根据权利要求1所述的肌钙蛋白I检测方法,其特征在于:所述步骤S4,包括以下步骤:

D1、使用分子筛层析法,分离纯化cTnI-Fc结合蛋白复合物。

一种肌钙蛋白I检测测试方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域；具体地说，是涉及一种肌钙蛋白I检测测试方法。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白(cTn)是存在于心肌肌原纤维中细肌丝上的收缩调节蛋白，主要调节心肌收缩过程中粗、细肌丝之间的相对滑行。cTn含三个亚单位：肌钙蛋白I(CTnI)、肌钙蛋白T(cTnT)和肌钙蛋白C(cTnC)。心肌钙蛋白I(cTnI)是一个分子量为22.5KD的心肌蛋白，它与肌钙蛋白T(TnT)、肌钙蛋白C(TnC)一起形成一个心肌钙蛋白复合物，共同完成细胞内肌动蛋白间相互作用的钙信号传递的基本功能。

[0003] 目前现有技术中，肌钙蛋白I的检测方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫分析纸条检测、管式化学发光法等。肌钙蛋白I测定对灵敏度要求极高，目前化学发光法测试灵敏度最高，可实现0.03ng/mL的功能灵敏度检测能力，达到超敏检出级别。

[0004] 但是0.03ng/mL目前处于市面上化学发光诊断试剂的检出极限，无论是试剂及仪器的波动，产品的性能就会出现对0.03ng/mL浓度附近样本检测的不准确性。提升肌钙蛋白I是所有医疗诊断行业的目标。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服上述传统技术的不足之处，提供一种肌钙蛋白I检测测试方法，可实现0.01ng/mL功能灵敏度的测定。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术措施来达到的：

一种肌钙蛋白I检测测试方法，包括以下步骤：

S1、Fc结合蛋白进行吡啶酯标记；

S2、cTnI单抗进行吡啶酯标记；

S3、Fc结合蛋白与cTnI单抗反应；

S4、分离未结合的BSA。

[0007] 作为一种改进：所述步骤S1，包括以下步骤：

A1、取Fc结合蛋白溶解于MES溶液中，充分溶解，配置成0.5-2.0mg/mL的BSA溶液；

A2、向A1的产物中加入偶联剂EDC溶液；

A3、向A2的产物中加入吡啶酯溶液；

A4、向A3的产物中加入甘氨酸溶液；

A5、对A4的产物进行超滤，除去未结合的过量的吡啶酯。

[0008] 作为一种改进：在步骤A1中，所述Fc结合蛋白的质量为0.5-2.0mg，所述MES溶液的体积为1ml；

在步骤A2中，所述Fc结合蛋白溶液的体积为1ml，所述偶联剂EDC的浓度为10-50mg/mL，所述偶联剂EDC的体积为50-100ul，于25-37℃温度下，反应0.5-1h；

在步骤A3中，所述吡啶酯溶液的浓度为0.5-2.0 mg/mL，所述吡啶酯溶液的体积为

50uL,于25-37°C温度下,反应0.5-1h。

[0009] 在步骤A4中,所述甘氨酸溶液的浓度为5.0-10mg/mL,所述甘氨酸溶液的体积为1mL,于25-37°C温度下,反应20-30min。

[0010] 在步骤A5中,使用10-30KD超滤管,转速6000-8000rpm,时间15-30min。

[0011] 作为一种改进:所述步骤S2,包括以下步骤:

B1、取cTnI单抗溶解于MES溶液中,充分溶解,配置成0.5-1mg/mL的BSA溶液;

B2、向B1的产物中加入偶联剂EDC溶液;

B3、向B2的产物中加入吡啶酯溶液;

B4、向B3的产物中加入甘氨酸溶液;

B5、对B4的产物进行超滤,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0012] 作为一种改进:在步骤B1中,所述cTnI单抗的质量为0.5-1mg,所述MES溶液的体积为1ml;

在步骤B2中,所述cTnI单抗溶液的体积为1ml,所述偶联剂EDC的浓度为10-50mg/mL,所述偶联剂EDC的体积为50-100ul,于25-37°C温度下,反应0.5-1h;

在步骤B3中,所述吡啶酯溶液的浓度为0.5-1mg/mL,所述吡啶酯溶液的体积为50uL,于25-37°C温度下,反应0.5-1h。

[0013] 在步骤B4中,所述甘氨酸溶液的浓度为5.0-10mg/mL,所述甘氨酸溶液的体积为1mL,于25-37°C温度下,反应20-30min。

[0014] 在步骤B5中,使用10-30KD超滤管,转速6000-8000rpm,时间15-30min。

[0015] 作为一种改进:所述步骤S3,包括以下步骤:

C1、将吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白进行混合、反应。

[0016] 作为一种改进:在步骤C1中,吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白的摩尔比为1:1~1:5,于25-37°C温度下,反应20-30min。

[0017] 作为一种改进:所述步骤S4,包括以下步骤:

D1、使用分子筛层析法,分离纯化cTnI-Fc结合蛋白复合物。

[0018] 由于采用了上述技术方案,与现有技术相比,本发明的优点是:吡啶酯属于闪光型标记物,与激发液混合后,能够瞬时达到一个极高的发光值,将吡啶酯标记物标记在cTnI单抗上和Fc结合蛋白上,通过单抗上的Fc区域与Fc结合蛋白反应,形成一个cTnI单抗-Fc结合蛋白复合物,该复合物将有更多的吡啶酯载量,能够瞬时激发出更高信号的发光值,实现0.01ng/mL功能灵敏度的测定。

[0019] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步说明。

附图说明

[0020] 附图1是本发明技术方案检测结果对照示意图。

[0021] 附图2是本发明技术方案CV情况对照示意图。

具体实施方式

[0022] 实施例1:一种肌钙蛋白I检测方法,包括以下步骤。

[0023] S1、Fc结合蛋白进行吡啶酯标记。

[0024] 所述步骤S1,包括以下步骤:

A1、取0.5mgFc结合蛋白溶解于1mlMES溶液中,充分溶解,配置成0.5mg/mL的BSA溶液;

A2、向1mlA1的产物中加入浓度为10mg/mL的偶联剂EDC溶液50 μ l,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应0.5h;

A3、向A2的产物中加入浓度为0.5mg/mL的吡啶酯溶液50 μ L,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应0.5h;

A4、向A3的产物中加入浓度为5.0mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应20min;

A5、使用10KD超滤管对A4的产物进行超滤,转速6000rpm,时间15min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0025] S2、cTnI单抗进行吡啶酯标记,包括以下步骤。

[0026] 所述步骤S2,包括以下步骤:

B1、取0.5mgcTnI单抗溶解于1mlMES溶液中,充分溶解,配置成0.5mg/mL的BSA溶液;

B2、向1mlB1的产物中加入浓度为10mg/mL的偶联剂EDC溶液50 μ l,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应0.5h;

B3、向B2的产物中加入浓度为0.5mg/mL的吡啶酯溶液50 μ L,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应0.5h;

B4、向B3的产物中加入浓度为5.0mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应20min;

B5、使用10KD超滤管,对B4的产物进行超滤,转速6000rpm,时间15min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0027] S3、Fc结合蛋白与cTnI单抗反应,包括以下步骤:

所述步骤S3,包括以下步骤:

C1、将吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白按摩尔比为1:1进行混合,于25 $^{\circ}$ C温度下,反应20min。

[0028] S4、分离未结合的BSA,包括以下步骤。

[0029] 所述步骤S4,包括以下步骤:

D1、使用分子筛层析法,分离纯化cTnI-Fc结合蛋白复合物。

[0030] 实施例2:一种肌钙蛋白I检测方法,包括以下步骤。

[0031] S1、Fc结合蛋白进行吡啶酯标记。

[0032] 所述步骤S1,包括以下步骤:

A1、取1.0mgFc结合蛋白溶解于1mlMES溶液中,充分溶解,配置成1.0mg/mL的BSA溶液;

A2、向1mlA1的产物中加入浓度为25mg/mL的偶联剂EDC溶液65 μ l,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应0.65h;

A3、向A2的产物中加入浓度为1.0mg/mL的吡啶酯溶液50 μ L,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应0.65h;

A4、向A3的产物中加入浓度为6.5mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应23min;

A5、使用20KD超滤管对A4的产物进行超滤,转速7000rpm,时间16.5min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0033] S2、cTnI单抗进行吡啶酯标记,包括以下步骤。

[0034] 所述步骤S2,包括以下步骤:

B1、取0.65mgcTnI单抗溶解于1mlMES溶液中,充分溶解,配置成0.65mg/mL的BSA溶液;

B2、向1mlB1的产物中加入浓度为25mg/mL的偶联剂EDC溶液65 μ l,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应0.65h;

B3、向B2的产物中加入浓度为0.65mg/mL的吡啶酯溶液50 μ L,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应0.65h;

B4、向B3的产物中加入浓度为6.5mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应23min;

B5、使用20KD超滤管,对B4的产物进行超滤,转速7000rpm,时间20min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0035] S3、Fc结合蛋白与cTnI单抗反应,包括以下步骤:

所述步骤S3,包括以下步骤:

C1、将吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白按摩尔比为1:1~1:5进行混合,于29 $^{\circ}$ C温度下,反应23min。

[0036] S4、分离未结合的BSA,包括以下步骤。

[0037] 所述步骤S4,包括以下步骤:

D1、使用分子筛层析法,分离纯化cTnI-Fc结合蛋白复合物。

[0038] 实施例3:一种肌钙蛋白I检测方法,包括以下步骤。

[0039] S1、Fc结合蛋白进行吡啶酯标记。

[0040] 所述步骤S1,包括以下步骤:

A1、取1.5mgFc结合蛋白溶解于1mLMES溶液中,充分溶解,配置成1.5mg/mL的BSA溶液;

A2、向1mLA1的产物中加入浓度为40mg/mL的偶联剂EDC溶液80 μ l,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应0.8h;

A3、向A2的产物中加入浓度为1.5mg/mL的吡啶酯溶液50 μ L,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应0.8h;

A4、向A3的产物中加入浓度为8mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应26min;

A5、使用20KD超滤管对A4的产物进行超滤,转速7000rpm,时间25min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0041] S2、cTnI单抗进行吡啶酯标记,包括以下步骤。

[0042] 所述步骤S2,包括以下步骤:

B1、取0.8mgcTnI单抗溶解于1mLMES溶液中,充分溶解,配置成0.8mg/mL的BSA溶液;

B2、向1mLB1的产物中加入浓度为40mg/mL的偶联剂EDC溶液80 μ l,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应0.8h;

B3、向B2的产物中加入浓度为0.8mg/mL的吡啶酯溶液50 μ L,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应0.8h;

B4、向B3的产物中加入浓度为8mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应26min;

B5、使用20KD超滤管,对B4的产物进行超滤,转速7000rpm,时间25min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0043] S3、Fc结合蛋白与cTnI单抗反应,包括以下步骤:

所述步骤S3,包括以下步骤:

C1、将吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白按摩尔比为1:3进行混合,于33 $^{\circ}$ C温度下,反应26min。

[0044] S4、分离未结合的BSA,包括以下步骤。

[0045] 所述步骤S4,包括以下步骤:

D1、使用分子筛层析法,分离纯化cTnI-Fc结合蛋白复合物。

[0046] 实施例4:一种肌钙蛋白I检测方法,包括以下步骤。

[0047] S1、Fc结合蛋白进行吡啶酯标记。

[0048] 所述步骤S1,包括以下步骤:

A1、取2.0mgFc结合蛋白溶解于1mlMES溶液中,充分溶解,配置成2.0mg/mL的BSA溶液;

A2、向1mlA1的产物中加入浓度为50mg/mL的偶联剂EDC溶液100u1,于37°C温度下,反应1h;

A3、向A2的产物中加入浓度为2.0mg/mL的吡啶酯溶液50uL,于37°C温度下,反应1h;

A4、向A3的产物中加入浓度为10mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于37°C温度下,反应30min;

A5、使用30KD超滤管对A4的产物进行超滤,转速8000rpm,时间30min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0049] S2、cTnI单抗进行吡啶酯标记,包括以下步骤。

[0050] 所述步骤S2,包括以下步骤:

B1、取1mgcTnI单抗溶解于1mlMES溶液中,充分溶解,配置成1mg/mL的BSA溶液;

B2、向1mlB1的产物中加入浓度为50mg/mL的偶联剂EDC溶液100u1,于37°C温度下,反应1h;

B3、向B2的产物中加入浓度为1mg/mL的吡啶酯溶液50uL,于37°C温度下,反应1h;

B4、向B3的产物中加入浓度为10mg/mL的甘氨酸溶液1mL,于37°C温度下,反应30min;

B5、使用30KD超滤管,对B4的产物进行超滤,转速8000rpm,时间30min,除去未结合的过量的吡啶酯。

[0051] S3、Fc结合蛋白与cTnI单抗反应,包括以下步骤:

所述步骤S3,包括以下步骤:

C1、将吡啶酯标记的cTnI单抗和吡啶酯标记的Fc结合蛋白按摩尔比为1:5进行混合,于37°C温度下,反应30min。

[0052] S4、分离未结合的BSA,包括以下步骤。

[0053] 所述步骤S4,包括以下步骤:

D1、使用分子筛层析法,分离纯化cTnI-Fc结合蛋白复合物。

[0054] 如图1所示,对照试剂为目前市场上肌钙蛋白I检测灵敏度最高的产品,雅培超敏肌钙蛋白I测定试剂盒。实施1-4为使用本发明专利技术对吡啶酯标记物进行改造的试剂。对照组对20例临床心肌损伤病例检查结果中有8例样本检测结果为0,而实施例对20例临床心肌损伤病例样本检测结果均能检测出结果。

[0055] 如图2所示,功能灵敏度是能够准确进行定量检测的下限,一般认为在测量较低浓度样本时,重复测试20次,CV<20%的最低浓度点。下表为对照试剂和实施例同时测试0.03ng/mL浓度样本20次的CV情况,0.03ng/mL是对照试剂宣称的最低浓度点。由数据可以看出,实施例在该浓度时,CV只有6%,说明实施例分析灵敏度浓度值要低于0.03ng/mL,灵敏度高于对照试剂。

[0056] 以上对本发明的数个实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,不能被用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等,均应归属于本发明的专利涵盖范围之内。

样本	对照试剂	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
临床样本 1	0.000	0.016	0.064	0.054	0.015
临床样本 2	0.000	0.014	0.033	0.021	0.021
临床样本 3	0.000	0.050	0.059	0.060	0.069
临床样本 4	0.000	0.034	0.022	0.056	0.013
临床样本 5	0.000	0.008	0.017	0.058	0.043
临床样本 6	0.000	0.022	0.021	0.030	0.027
临床样本 7	0.000	0.032	0.022	0.026	0.032
临床样本 8	0.000	0.001	0.000	0.018	0.065
临床样本 9	0.029	0.000	0.071	0.025	0.002
临床样本 10	0.036	0.024	0.020	0.017	0.016
临床样本 11	0.041	0.016	0.017	0.002	0.061
临床样本 12	0.044	0.012	0.034	0.001	0.006
临床样本 13	0.045	0.011	0.015	0.010	0.034
临床样本 14	0.061	0.018	0.053	0.006	0.020
临床样本 15	0.063	0.022	0.004	0.000	0.002
临床样本 16	0.065	0.032	0.070	0.036	0.018
临床样本 17	0.070	0.017	0.021	0.005	0.011
临床样本 18	0.096	0.050	0.015	0.005	0.002
临床样本 19	0.099	0.013	0.008	0.012	0.049
临床样本 20	0.099	0.011	0.016	0.006	0.053

图1

测试次数	对照试剂	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
1	0.033	0.027	0.030	0.027	0.032
2	0.023	0.030	0.032	0.031	0.033
3	0.035	0.030	0.028	0.031	0.032
4	0.023	0.029	0.032	0.028	0.028
5	0.033	0.027	0.031	0.032	0.032
6	0.029	0.030	0.031	0.030	0.032
7	0.035	0.032	0.029	0.027	0.028
8	0.037	0.028	0.029	0.032	0.033
9	0.024	0.031	0.030	0.031	0.028
10	0.033	0.027	0.028	0.032	0.028
11	0.024	0.027	0.028	0.030	0.030
12	0.024	0.030	0.027	0.029	0.031
13	0.029	0.031	0.031	0.033	0.028
14	0.032	0.030	0.032	0.030	0.027
15	0.030	0.031	0.028	0.028	0.030
16	0.033	0.030	0.032	0.030	0.029
17	0.028	0.027	0.028	0.030	0.030
18	0.026	0.030	0.033	0.031	0.031
19	0.024	0.028	0.030	0.027	0.031
20	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029
CV	16%	6%	6%	6%	6%

图2