



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110988363 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911401981.X

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 苏州康和顺医疗技术有限公司

地址 215010 江苏省苏州市高新区鹿山路
369号29幢403-3室

(72)发明人 刘向晖 汪春芳 陈胜胜

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/51(2006.01)

G01N 21/59(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

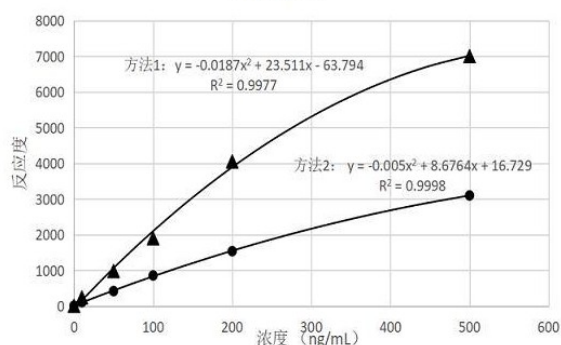
(54)发明名称

一种抗病毒蛋白MxA的检测试剂及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗病毒蛋白MxA的胶乳增强免疫比浊检测单试剂以及制备方法。本发明采用单一试剂,无需混合,灵敏度高,检测速度快,能够直接测量全血、血清和血浆等各种样本,因此可广泛应用于各种透射或者散射分析仪,包括普通生化分析仪、特定蛋白分析仪等。

定标曲线



1. 一种抗病毒蛋白MxA (MxA) 胶乳增强免疫比浊检测单试剂, 其特征在于所述单试剂包括0.15mg/mL的MxA抗体致敏胶乳颗粒、10mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸、1g/L牛血清白蛋白、3-6g/L聚乙烯磺酸钠、1-2g/L十二烷基聚乙二醇醚以及1g/L Proclin300, pH=6.5, 其中聚乙烯磺酸钠与十二烷基聚乙二醇醚的比例为3:1;

其中所述的MxA抗体致敏胶乳颗粒是按照如下方法制备的:

(1) 制备活化胶乳颗粒: 取粒径333nm、浓度为10mg/mL的羧基化聚苯乙烯微球0.18mL, 加入25mM pH6.5的MES 3.6mL, 搅拌10min, 加入EDC活化剂粉末7.04mg, 室温搅拌2.5h后12000rpm离心收集沉淀, 25mM pH6.5的MES 1.8mL 重悬沉淀;

(2) 制备致敏胶乳颗粒: 1.8mL 25mM pH6.5的MES中放入0.18mL浓度为4.0mg/mL的MxA多克隆抗体, 搅拌1min, 制成待偶联抗体溶液; 将(1)中的活化胶乳颗粒快速倒入待偶联抗体溶液中, 搅拌2.5h; 12000rpm离心收集沉淀, 120mL封闭液重悬后搅拌2.5h即得单试剂抗病毒蛋白MxA (MxA) 胶乳增强免疫比浊试剂; 封闭液的组分为10mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸、1g/L牛血清白蛋白、3-6g/L聚乙烯磺酸钠、1-2g/L十二烷基聚乙二醇醚以及1g/L Proclin300, pH=6.5, 聚乙烯磺酸钠与十二烷基聚乙二醇醚的比例为3:1。

一种抗病毒蛋白MxA的检测试剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫诊断领域,具体涉及一种抗病毒蛋白MxA (MxA)的胶乳增强免疫比浊检测单试剂的制备及其应用。

背景技术

[0002] Mx蛋白是干扰素诱导调控的一类具有抗病毒活性的蛋白,广泛存在于脊椎动物体内。1963年首先在老鼠体内发现被命名为Mx1,1985年在人体内发现同源蛋白命名为MxA。干扰素是人体抵御病毒感染的第一道防线,在人体感染病毒后能够诱导MxA的大量表达,因此测量人体内的MxA的含量可以用于病毒感染的检测和诊断。MxA的血清浓度在正常人体内一般在50ng/mL以下,病毒感染后浓度一般在200ng/mL以上。MxA的检测可以和常见的细菌感染指标如CRP、PCT等进行组合,是一种快速区分感染类型的检验方法,可以更好地指导临床用药

MxA的常见检测方法有酶联免疫法、胶体金法、荧光层析法、胶乳增强免疫比浊法。这些方法中以胶乳增强免疫比浊法最先进,灵敏度更高,线性范围更广,操作也相对简便。胶乳增强免疫比浊法利用吸附在直径几十到几百纳米的胶乳微粒上的MxA抗体捕捉测试样品中的MxA,从而形成微粒之间的交联,改变了溶液的散射度或者透射吸光度(即浊度)。通过测量溶液的散射度或者透射吸光度的变化,可以根据定标曲线定量地计算出测试样品中MxA的浓度。该测试方法既可以在通用的大型自动生化分析仪上运用,也可以在特定蛋白分析仪等小型的POCT(即时检测)设备上采用,有很强的适用性,可以很好地满足我国从大型三甲医院到社区基层医院的使用需求。

[0003] 现在市场上已有的MxA胶乳增强免疫比浊试剂采用的是稀释液和胶乳溶液的双试剂形式。在测试时,测试样品必须先稀释在稀释液中,再和胶乳溶液进行混合反应。三甲医院常用仪器平台上,稀释和混合的操作可由大型全自动生化分析仪完成,但是在小型半自动平台上尤其是POCT类的便携式平台(三级以下医院以及县乡一级医疗服务单位常用)上进行的测试则需要操作人员手动实施,带来了额外的操作步骤,也引入了更多的操作误差,影响了测试的精密度。

发明内容

[0004] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的是提供一种单一试剂,无需混合试剂,灵敏度高,检测速度快的抗病毒蛋白MxA (MxA)的胶乳增强免疫比浊检测试剂。该试剂既可以在大型自动生化分析仪上进行测试,也可以在特定蛋白仪等小型POCT设备上进行测试。

[0005] 在背景技术的介绍中提到,市场上常见的胶乳增强免疫检测试剂采用的是双试剂的检测形式。其中稀释液常被称为R1,胶乳溶液常被称为R2。纯粹的抗体或者抗原包被的微球的胶乳溶液是热力学不稳定体系,如果没有特殊的处理,胶乳会自发地凝集。因此,一般地,检测试剂中的胶乳溶液(R2)需要通过优化溶液的组成来保证胶乳溶液的稳定性,阻止胶乳在储存时发生自发凝集。常见的优化手段包括选用不同的缓冲体系、改变微球表面电荷、

改变溶液离子强度、添加稳定剂等手段(J.A. Molina Bolivar et al, *Journal of Macromolecular Science Part C - Polymer Reviews*, 2005, 45:59-98)。然而当胶乳溶液用于测试时,由抗原抗体的特异性结合导致的胶乳凝集就不应该被阻止,这就要求稀释液(R1)能够在一定程度上有益于胶乳凝集的形成。所以一般稀释液(R1)和胶乳储存液(R2)在配方上有很大的区别。直接将R1和R2混合,一般会导致胶乳不稳定。这也是市场上胶乳试剂一般都采用双试剂形式的主要原因。

[0006] 在本发明中,除了常规的稳定胶乳试剂的方法以外,我们还引入了表面活性剂来优化试剂配方稳定胶乳溶液。表面活性剂可以提供空间位阻,离子型的表面活性剂还可以提供额外的静电斥力,从而阻止胶乳的凝聚,在储存时稳定胶乳试剂。同时,通过优化试剂配方,当含有MxA的样本接触胶乳试剂时,合适的表面活性剂能够促进MxA抗原和MxA抗体的相互作用,有利于形成特异性的胶乳凝集。这样我们就制备了一种单试剂形式的MxA胶乳试剂。在储存时,该试剂可以稳定存放,在接触样品时,该试剂可以迅速发生凝集反应,不再需要混合其他的稀释液来促进凝集反应。而且优选的表面活性剂种类和浓度可以有效溶解血液中血细胞,从而使得本发明中的检测试剂可以直接测量全血的样本,具备了同时检测全血、血清和血浆的能力。

[0007] 本发明所述的抗病毒蛋白MxA(MxA)检测试剂包括MxA抗体致敏胶乳颗粒、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、牛血清白蛋白、聚乙烯磺酸钠、十二烷基聚乙二醇醚以及Proclin300,聚乙烯磺酸钠与十二烷基聚乙二醇醚的比例为3:1。

[0008] 所述的MxA抗体致敏胶乳颗粒的浓度为0.15mg/mL。

[0009] 所述的4-羟乙基哌嗪乙磺酸浓度为10mM。

[0010] 所述的牛血清白蛋白浓度为1g/L。

[0011] 所述的聚乙烯磺酸钠浓度为3-6g/L。

[0012] 所述的十二烷基聚乙二醇醚浓度为1-2g/L。

[0013] 所述的Proclin300浓度为1g/L。

[0014] 优选的,MxA抗体致敏胶乳颗粒是按照如下方法制备的:

(1)制备活化胶乳颗粒:取粒径333nm、浓度为10mg/mL的羧基化聚苯乙烯微球0.18mL,加入25mM pH6.5的MES 3.6mL,搅拌10min,加入EDC活化剂粉末7.04mg,室温搅拌2.5h后12000rpm离心收集沉淀,25mM pH6.5的MES 1.8mL 重悬沉淀。

[0015] (2)制备致敏胶乳颗粒:1.8mL 25mM pH6.5的MES中放入0.18mL浓度为4.0mg/mL的MxA多克隆抗体,搅拌1min,制成待偶联抗体溶液。将(1)中的活化胶乳颗粒快速倒入待偶联抗体溶液中,搅拌2.5h。12000rpm离心收集沉淀,120mL封闭液重悬后搅拌2.5h即得单试剂抗病毒蛋白MxA(MxA)胶乳增强免疫比浊试剂。封闭液的组分为10mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸、1g/L牛血清白蛋白、3-6g/L聚乙烯磺酸钠、1-2g/L十二烷基聚乙二醇醚以及1g/L Proclin300,pH=6.5,聚乙烯磺酸钠与十二烷基聚乙二醇醚的比例为3:1。

[0016] 本发明所述的试剂检测方法如下:

检测样品时,本发明提供的试剂中胶乳颗粒上的MxA抗体与样品中的MxA抗原发生抗体抗原反应,从而使得胶乳逐渐凝聚,改变了测试液的浊度。浊度的变化可以通过透射仪或者散射仪来测定。透射的吸光度或者散射光强度与样品中的MxA浓度在一定浓度范围内成线性关系。通过参考MxA校准品建立的定标曲线,可以定量地计算出被测样品中MxA的浓度。

[0017] 本发明的有益效果包括：

1. 检测试剂的组成简单，只有单一试剂，不需要像市场现有试剂那样在测试时进行R1、R2的混合操作，简化了操作程序。尤其是在使用半自动POCT设备的时候，为操作人员带来极大的便利，同时也更好地保障了测试的精确性。

[0018] 2. 试剂同时具有溶血和检测的功能，可以直接测试全血样品，不需要进行血清、血浆提取的工作，简化了操作，大大缩短了包括样品准备在内的整个测试时间。

[0019] 3. 该试剂反应快速，反应时间只需要2到3分钟。相比现有双试剂胶乳试剂10到12分钟的检测时间，速度提高接近4倍，从而大大提升了检测效率，尤其有利于门诊的快速检测。

[0020] 4. 该试剂灵敏度高，空白限为5ng/mL。

[0021] 5. 试剂适用性好，可以在透射或者散射仪上使用。既可以在全自动大型生化仪上使用，也可以在小型POCT设备上使用。可以同时满足大型医院检验科、住院部、小型医院门诊、以及急诊科室的检测需要。

附图说明

[0022] 图1为实施例1在POCT设备上的定标曲线

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细阐述。下述的实施例是为了进一步说明本发明的一些优选实施例，并非全部实施例。本领域专业人员在没有进行创造性劳动的前提下做出的基于本发明的其他实施例，都属于本发明的权利保护范围。

[0024] 实施例1

1) 胶乳试剂的制备

制备方法1与2在表面活性剂的组合上存在差异。

[0025] 制备方法1：制备活化胶乳颗粒：取粒径333nm、浓度为10mg/mL的羧基化聚苯乙烯微球0.18mL，加入25mM pH6.5的MES 3.6mL，搅拌10min，加入EDC活化剂粉末7.04mg，室温搅拌2.5h后12000rpm离心收集沉淀，25mM pH6.5的MES 1.8mL 重悬沉淀。

[0026] 制备致敏胶乳颗粒：1.8mL 25mM pH6.5的MES中放入0.18mL浓度为4.0mg/mL的MxA多克隆抗体，搅拌1min，制成待偶联抗体溶液。将(1)中的活化胶乳颗粒快速倒入待偶联抗体溶液中，搅拌2.5h。12000rpm离心收集沉淀，120mL封闭液重悬后搅拌2.5h即得单试剂抗病毒蛋白MxA (MxA) 胶乳增强免疫比浊试剂。封闭液的组分为10mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸、1g/L牛血清白蛋白、3g/L聚乙烯磺酸钠、1g/L十二烷基聚乙二醇醚以及1g/L Proclin300，pH=6.5，聚乙烯磺酸钠与十二烷基聚乙二醇醚的比例为3:1。

[0027] 制备方法2：制备活化胶乳颗粒：取粒径333nm、浓度为10mg/mL的羧基化聚苯乙烯微球0.18mL，加入25mM pH6.5的MES 3.6mL，搅拌10min，加入EDC活化剂粉末7.04mg，室温搅拌2.5h后12000rpm离心收集沉淀，25mM pH6.5的MES 1.8mL 重悬沉淀。

[0028] 制备致敏胶乳颗粒：1.8mL 25mM pH6.5的MES中放入0.18mL浓度为4.0mg/mL的MxA多克隆抗体，搅拌1min，制成待偶联抗体溶液。将(1)中的活化胶乳颗粒快速倒入待偶联抗体溶液中，搅拌2.5h。12000rpm离心收集沉淀，120mL封闭液重悬后搅拌2.5h即得单试剂抗

病毒蛋白MxA (MxA) 胶乳增强免疫比浊试剂。封闭液的组分为10mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸、1g/L牛血清白蛋白、5g/L Triton X-100以及1g/L Proclin300,pH=6.5。

[0029] 2) 校准品的制备

将市售的MxA抗原用校准品稀释液配制成一系列校准品,浓度分别为0ng/mL,10ng/mL,50ng/mL,100ng/mL,200ng/mL,500ng/mL。

[0030] 3) 质控品的制备

将高浓度的MxA样品(500ng/mL)用校准品稀释液分别稀释两倍和二十倍成250ng/mL和25ng/mL,分别作为高值质控品和低值质控品。

[0031] 4) 在POCT设备上建立定标曲线。

[0032] 将6个MxA校准品,浓度从0到500ng/mL,分别与配制的MxA胶乳单试剂在反应杯中反应,用POCT设备(本例中使用劳拉电子半自动特定蛋白分析仪EZ-400)进行检测,记录反应度。检测波长为650nm,检测散射光强度,采用两点速率法,反应时间120s,计算两点反应度差值。根据浓度和反应度差值可以建立定标曲线。图1是实施例1中按制备方法1和2得到的胶乳单试剂建立的定标曲线。

[0033] 实施例2

试剂的灵敏度(空白限)

使用实施例1中的试剂,选用零值校准品作为空白样本测试,在POCT设备上测试浓度。重复测试20次,根据实施例1中建立的标准曲线计算20次测试结果的平均值(X)和标准差(SD),计算 $X+2SD$ 作为试剂的灵敏度。测试结果如表1所示,显示制备方法1所得试剂的灵敏度为5ng/mL,制备方法2所得的灵敏度为15ng/mL,说明表面活性剂的组合优化后,能明显的提升试剂检测的灵敏度。抗病毒蛋白MxA (MxA) 的检测临床参考值在50ng/mL左右,本发明中制备方法1中制备的MxA胶乳增强免疫比浊单试剂的灵敏度比参考值要小10倍,完全符合使用的需要。

[0034] 表1. 实施例1的试剂分析灵敏度测试结果

实施例1	分析灵敏度	
测试序号	制备方法1的测定结果 (ng/mL)	制备方法2的测定结果 (ng/mL)
1	3.65	7.68
2	3.76	6.66
3	1.26	12.43
4	3.31	3.28
5	1.99	1.55
6	3.6	4.45
7	3.67	3.57
8	1.75	5.93
9	0.86	2.72
10	0.99	8.69
11	3.91	8.3
12	3.84	8.04
13	3.46	7.2

14	0.81	11.71
15	3.84	2.23
16	2.36	10.93
17	3.24	13.98
18	1.92	5.88
19	2.51	14.71
20	1.73	4
平均值 (X)	2.62	7.20
SD	1.12	3.94
X+2SD	4.87	15.08

实施例3

试剂的重复性

用实施例1中制备的单试剂测试MxA浓度为50ng/mL左右的正常值水平的控制物质和MxA浓度为200ng/mL左右的异常值水平的控制物质,各重复测试10次,计算测量值的平均值(X)和标准差(SD)。按式(1)计算变异系数(CV)。测试结果见表2。根据测量结果,计算出变异系数CV= 5.35%和4.53%,符合试剂CV<10%的技术要求。

$$[0035] \quad CV = (SD/X) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

CV ——变异系数;

SD ——标准差;

X ——测量值的平均值。

[0036] 表2. 实施例1的重复性测量结果

实施例1	重复性	重复性
测定序号	测定结果 (50ng/mL)	测定结果 (200ng/mL)
1	49.13	198.10
2	47.01	194.50
3	52.22	208.08
4	52.38	193.05
5	52.25	193.45
6	45.62	209.98
7	50.81	207.75
8	51.91	213.87
9	49.80	197.47
10	46.06	186.15
平均值 (X)	49.72	200.24
SD	2.66	9.07
CV	5.35%	4.53%

实施例4

与市场上其他试剂的性能参数对比

本发明单试剂与市场上其他MxA试剂盒性能参数对比情况如表3所列。从表中可以看出,本发明的单试剂主要在检测样本类型、需要的试剂数量和种类、试剂的灵敏度和试剂的检测速度等方面明显优于市场上的对比试剂。

[0037] 表3. MxA试剂性能参数对比

生产厂家	实施例1	其他公司试剂
测试方法	散射比浊法	透射比浊法
样本类型	新鲜血清、血浆和全血	新鲜血清和血浆
试剂类型	液体,聚苯乙烯颗粒	液体,聚苯乙烯颗粒
试剂数量	1	2
试剂种类	单试剂胶乳	胶乳和辅助试剂
线性范围	5-500ng/mL	50-500ng/mL
检测耗时	2-3min	约10min
精密度	≤10%	≤10%
准确度	≤15%	未标明
批间差	≤10%	≤10%
是否需要配备稀释液	否	是
有效期	12个月	12个月

定标曲线

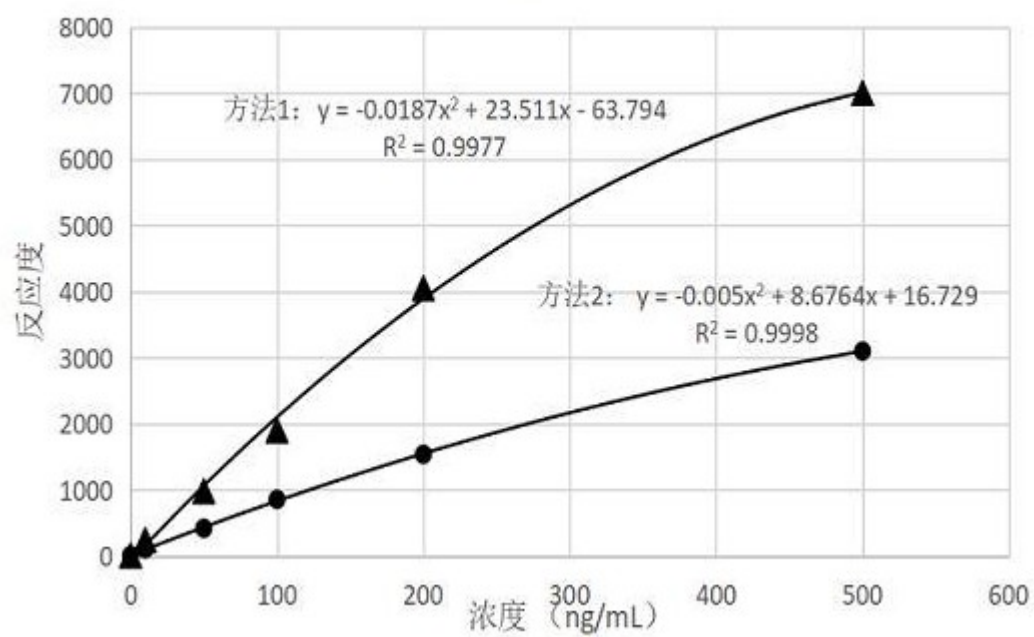


图1

专利名称(译)	一种抗病毒蛋白MxA的检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN110988363A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911401981.X	申请日	2019-12-31
[标]发明人	刘向晖 汪春芳 陈胜胜		
发明人	刘向晖 汪春芳 陈胜胜		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/51 G01N21/59		
CPC分类号	G01N21/51 G01N21/59 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/6866		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗病毒蛋白MxA的胶乳增强免疫比浊检测单试剂以及制备方法。本发明采用单一试剂，无需混合，灵敏度高，检测速度快，能够直接测量全血、血清和血浆等各种样本，因此可广泛应用于各种透射或者散射分析仪，包括普通生化分析仪、特定蛋白分析仪等。

定标曲线

