



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103837686 A

(43) 申请公布日 2014.06.04

(21) 申请号 201410079388.9

(22) 申请日 2014.03.06

(71) 申请人 上海北加生化试剂有限公司

地址 201802 上海市嘉定区南翔镇科富路
265号

(72) 发明人 朱晓敏 王泉龙 张瑞镐 刘颖冰

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
31001

代理人 林炜

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/549(2006.01)

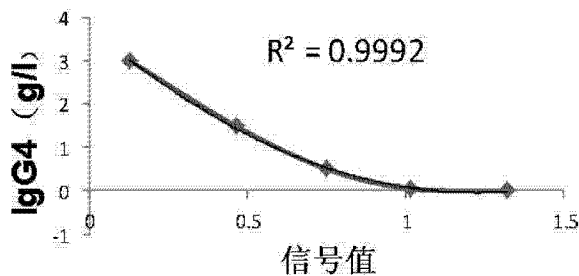
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒,包括一个固相载体,固相载体上结合有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,还包括一个胶体金标记的特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白。本发明还提供了上述试剂盒的制备方法。本发明是将特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体固相于载体,用以捕获人血清中的免疫球蛋白 G4 抗原,再将抗免疫球蛋白 G4 抗体胶体金标记物作为示踪物,如被测人血清中含有免疫球蛋白 G4 抗原,则固相载体呈红色斑点反应。本发明可以目测测量也可以使用仪器测量,检测样本可以是人的血清或血浆或全血。本发明可以作为快速检测人血清免疫球蛋白 G4 使用。



1. 一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒,包括一个固相载体,其特征在于:所述的固相载体上结合有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,还包括一个胶体金标记物,所述的胶体金标记物是胶体金标记的特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或胶体金标记的含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒,其特征在于:所述的特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白通过物理吸附、或生物活性、或化学基团偶联的方法固相于载体。

3. 如权利要求 1 所述的一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒,其特征在于:所述的固相载体为纤维素酯类微孔膜、或者聚酰胺类微孔膜、或者聚砜类微孔膜、或者含氟类微孔膜、或者聚碳酸酯、或者聚酯类微孔膜、或者聚烯烃类微孔膜、或者无机材料微孔膜、或者玻璃纤维。

4. 权利要求 1 所述的一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒的制备方法,其特征在于:包括一个制备固相载体的步骤,在所述的制备固相载体的过程中,将特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白通过物理吸附、或生物活性、或化学基团偶联的方法固相于载体,还包括一个将胶体金标记于抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白的步骤。

5. 一种检测人免疫球蛋白 G4 的装置,包括一个箱体,其特征在于:所述的箱体中设置一个薄板,所述的薄板上设置一个第一载体,所述的第一载体的一端设置有一个吸水垫,所述的第一载体的另外一端设置有一个第二载体,所述的第一载体上设置有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,所述的第二载体上设置有胶体金标记的抗人免疫球蛋白 G4 抗体或胶体金标记的含抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,所述的箱体上设置有检测窗口。

6. 如权利要求 5 所述的一种检测人免疫球蛋白 G4 的装置,其特征在于:所述的载体为纤维素酯类微孔膜、或者聚酰胺类微孔膜、或者聚砜类微孔膜、或者含氟类微孔膜、或者聚碳酸酯、或者聚酯类微孔膜、或者聚烯烃类微孔膜、或者无机材料微孔膜、或者玻璃纤维。

7. 采用权利要求 1 的试剂盒检测人免疫球蛋白 G4 的方法,其特征在于:包括一个将被测人血清、血浆或者全血加入固相载体的过程,如被测人血清、血浆或者全血含有人免疫球蛋白 G4,则形成固相特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体—免疫球蛋白 G4 抗原—特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体胶体金标记物,固相载体呈红色,反之呈无色。

8. 采用权利要求 1 的试剂盒检测人免疫球蛋白 G4 的方法,其特征在于:包括一个将被测人血清、血浆或者全血加入固相载体的过程,然后将固相载体放置与金标读数仪中,在波长 510-550nm 读数,根据标准曲线来计算被测人血清、血浆或者全血中人免疫球蛋白 G4 的含量。

9. 采用权利要求 1 的试剂盒检测人免疫球蛋白 G4 的方法,其特征在于:包括一个将被测人血清、血浆或者全血加入固相载体的过程,然后利用 CCD 图像扫描技术对胶体金产物进行图像扫描,然后对扫描后的图像加以分析,计算被测人血清、血浆或者全血中人免疫球蛋白 G4 的含量。

一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属生物工程领域,涉及一种试剂盒,具体来说是一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 人免疫球蛋白 G4 (IgG4)是人免疫球蛋白的一个重要亚类。国外测定人免疫球蛋白 G4 的试剂盒是采用 ELISA 技术及免疫增强散射技术。采用 ELISA 技术的测定试剂盒,其检测过程耗时漫长,且需样本批量检测,患者不能及时得到检测报告。采用免疫增强散射技术的测定试剂盒虽在一定程度上弥补了上述方法的缺点,但是需昂贵的专门仪器,检测一个样本需 20 分钟,且不能使用全血样品。发明内容

[0003] 针对上述现有技术中存在的缺陷,本发明所要解决的技术问题是提供一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒及其制备方法,所述的这种试剂盒检测方便及时,而且成本低。

[0004] 本发明一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒,包括一个固相载体,所述的固相载体上结合有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,还包括一个胶体金标记物,所述的胶体金标记物是胶体金标记的特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或胶体金标记的含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白。

[0005] 进一步的,所述的特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白通过物理吸附、或生物活性、或化学基团偶联的方法固相于载体。

[0006] 具体的,抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白是指具有或包含有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体特性的,即能与免疫球蛋白 G4 抗原发生抗原-抗体结合反应的一类物质。

[0007] 进一步的,所述的固相载体为纤维素酯类微孔膜、或者聚酰胺类微孔膜、或者聚砜类微孔膜、或者含氟类微孔膜、或者聚碳酸酯、或者聚酯类微孔膜、或者聚烯烃类微孔膜、或者无机材料微孔膜、或者玻璃纤维。

[0008] 本发明还提供了上述的一种检测人免疫球蛋白 G4 的试剂盒的制备方法,包括一个制备固相载体的步骤,在所述的制备固相载体的过程中,将特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白通过物理吸附、或生物活性、或化学基团偶联的方法固相于载体,还包括一个将胶体金标记于抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白的步骤。

[0009] 本发明还提供了一种检测人免疫球蛋白 G4 的装置,包括一个箱体,所述的箱体中设置一个薄板,所述的薄板上设置一个第一载体,所述的第一载体的一端设置有一个吸水垫,所述的第一载体的另外一端设置有一个第二载体,所述的第一载体上设置有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,所述的第二载体上设置有胶体金标记的抗人免疫球蛋白 G4 抗体或胶体金标记的含抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,所述的箱体上设置有检测窗口。

[0010] 进一步的,所述的载体为纤维素酯类微孔膜、或者聚酰胺类微孔膜、或者聚砜类微

孔膜、或者含氟类微孔膜、或者聚碳酸酯、或者聚酯类微孔膜、或者聚烯烃类微孔膜、或者无机材料微孔膜、或者玻璃纤维。

[0011] 具体的,所述的纤维素酯类微孔膜如醋酸纤维素(CA、CTA),硝化(酸)纤维素(CN),乙基纤维素(EC),混合纤维素(CN-CA)等。所述的聚酰胺类微孔膜如尼龙6(PA-6)和尼龙(PA-66)。所述的聚矾类微孔膜如聚矾(PS)和聚醚矾(PES)。所述的含氟类微孔膜如聚偏氟乙烯(PVDF)和聚四氟乙烯膜(PTFE)。所述的聚碳酸酯、聚酯类微孔膜和聚烯烃类微孔膜如聚丙烯(PP)。所述的无机材料微孔膜如陶瓷微孔膜、玻璃微孔膜,各类金属微孔膜等及玻璃纤维。

[0012] 本发明还提供了采用上述的试剂盒检测人免疫球蛋白 G4 的方法,包括一个将被测人血清、血浆或者全血加入固相载体的过程,如被测人血清、血浆或者全血含有人免疫球蛋白 G4,则形成固相特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体—免疫球蛋白 G4 抗原—特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体胶体金标记物,固相载体呈红色,反之呈无色。

[0013] 本发明还提供了采用上述的试剂盒检测人免疫球蛋白 G4 的方法,包括一个将被测人血清、血浆或者全血加入固相载体的过程,然后将固相载体放置与金标读数仪中,在波长 510-550nm 读数,根据标准曲线来计算被测人血清、血浆或者全血中人免疫球蛋白 G4 的含量。

[0014] 本发明还提供了采用上述的试剂盒检测人免疫球蛋白 G4 的方法,包括一个将被测人血清、血浆或者全血加入固相载体的过程,然后利用 CCD 图像扫描技术对胶体金产物进行图像扫描,然后对扫描后的图像加以分析,计算被测人血清、血浆或者全血中人免疫球蛋白 G4 的含量。

[0015] 本发明的工作原理是:采用双抗体夹心—胶体金标记原理,以检测人血清中的人免疫球蛋白 G4。将特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体固相于载体,制成固相载体,用以捕获人血清中存在的人免疫球蛋白 G4。再将胶体金标记于抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含抗人免疫球蛋白 G4 抗体活性物质的蛋白,形成胶体金标记物作为示踪物。如被测人血清中含有人免疫球蛋白 G4,则形成固相特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体—免疫球蛋白 G4 抗原—特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体胶体金标记物,呈红色反应,其颜色深浅与被测样本中含有的免疫球蛋白 G4 的浓度相关。

[0016] 本发明可使用人的血清、血浆或全血作为被测样本,以满足快速检测的需要。测定方法可以是定性目测,也可以使用仪器检测做定量或半定量测定。定性目测测定方法是目测固相载体上结合有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体的线(点)有无红色,无红色为阴性,有红色为阳性。

[0017] 定量或半定量测定方法采用的检测仪器是利用光反射原理对胶体金产物进行光反射密度测量,检测时使用的光波长范围是 510-550nm。或是利用 CCD 图像扫描技术对胶体金产物进行图像扫描,然后对扫描后的图像加以分析计算。定量或半定量测定时,使用仪器读取固相载体上结合有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体的线(点)的读数,结合标准曲线计算被测物的含量。

[0018] 本发明与已有技术相比,其技术进步是显著的。本发明提供了一种能快速、准确、安全、方便地检测人免疫球蛋白 G4 抗体的方法,以满足临床对于床边快速检验的需要。本发明可使用人血清或血浆样本,也可以使用人全血样本,极大地方便了样本的采集。且检测

成本仅为采用免疫增强散射技术的测定试剂盒成本的四分之一,检测收费仅为采用免疫增强散射技术的测定试剂盒收费的二分之一,本发明产品的临床应用将减少医疗保险费用的支出及减轻患者的医疗检查费用负担。本试剂盒可单份样本检测,也可多份样本检测,检测过程不超过 5 分钟,患者可随到随检,检测结果报告及时。

附图说明

[0019] 图 1 显示了采用本发明的试剂盒渗滤法检测人免疫球蛋白 G4 的标准曲线图。

[0020] 图 2 显示了采用本发明的试剂盒层析法检测人免疫球蛋白 G4 的标准曲线图。具体实施方式

[0021] 实施材料:

[0022] 1、塑料盒,分底座及面盖,面盖开有检测窗。

[0023] 2、胶体金——本实施采用柠檬酸三钠法制备的胶体金,胶体金颗粒直径 40nm。

[0024] 3、吸水层(纸)

[0025] 4、载体——本实施采用硝化(酸)纤维素膜(NC)。

[0026] 5、蛋白——抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体的蛋白。

[0027] 6、其它——磷酸盐、氯化钠、BSA、Tween 等。

[0028] 7、样本——SIEMENS 标准品,含人 IgG4 :0.05mg/l—3mg/l。

[0029] 8、检测仪器——本实施采用 FT-J5 金标读数仪,波长 :525—530nm。

[0030] 实施例 1

[0031] 人免疫球蛋白 G4 (胶体金)测定试剂盒——直流法(渗滤法)主要制作简介:

[0032] 1、检测反应盒制作流程:

[0033] 取检测反应盒底座平置,内置吸水层一片,在吸水层上放置硝酸纤维素膜一片,在膜上点加特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体,盖上检测反应盒面盖,压紧备用。

[0034] 2、胶体金标记物制作流程:

[0035] 取胶体金加入适量抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体的蛋白,混匀,备用。

[0036] 3、封闭液及洗涤液配制举例:

[0037] 封闭液——取 150mmol、pH7.0—7.5 磷酸盐缓冲液,其中添加 BSA 至终浓度为 1%。

洗涤液——取 150mmol、pH7.0—7.5 磷酸盐缓冲液,其中添加 Tween20 至终浓度为 0.05%。

[0038] 实验结果:

[0039] 使用本发明产品(渗滤法)检测 SIEMENS 标准品的人 IgG4,本发明产品(渗滤法)在 0.05mg/l—3mg/l (人 IgG4) 浓度范围内成线性,相关系数 ≥ 0.999 。本发明产品(胶体金渗滤法)的线性范围及检测范围与免疫增强散射比浊法(SIEMENS 公司产品)基本一致。

[0040] 实施例 2

[0041] 人免疫球蛋白 G4 (胶体金)测定试剂盒——横流法(层析法)主要制作简介:

[0042] 1、固相硝酸纤维素膜制作流程:

[0043] 取硝酸纤维素膜一片,在膜上点加有特异性抗人免疫球蛋白 G4 抗体,备用。

[0044] 2、胶体金标记物制作流程:

[0045] 取胶体金加入适量抗人免疫球蛋白 G4 抗体或含有抗人免疫球蛋白 G4 抗体的蛋

白,混匀,取适量加入到玻璃纤维,烘干,备用。

[0046] 3、检测反应盒制作流程:

[0047] 取检测反应盒底座平置,中间放置固相硝酸纤维素膜一片,在膜的一端连接吸水层一片,在膜的另一端连接已加有胶体金标记物的玻璃纤维,盖上检测反应盒面盖,压紧即可。

[0048] 实验结果:

[0049] 使用本发明产品(层析法)检测 SIEMENS 标准品的人 IgG4,本发明产品(渗滤法)在 0.05mg/l—3mg/l (人 IgG4) 浓度范围内成线性,相关系数 ≥ 0.999 。本发明产品(胶体金层析法)的线性范围及检测范围与免疫增强散射比浊法(SIEMENS 公司产品)基本一致。

[0050] 实施例 3

[0051] 使用免疫增强散射比浊法(某国外品牌试剂)与本发明(横、直流法)作配对检测 40 份样本的人免疫球蛋白 G4,检测结果进行 t 检验统计,以观察本发明与免疫增强散射比浊法检测结果的差异及本发明横流法与直流法检测结果的差异是否有显著性意义。

[0052]

样本	比浊法	横流法	直流法	样本	比浊法	横流法	直流法
	g/l	g/l	g/l		g/l	g/l	g/l
1#	2.40	2.47	2.42	21#	3.15	3.38	3.18
2#	1.59	1.49	1.55	22#	1.18	1.28	1.25
3#	3.11	3.03	3.13	23#	1.31	1.22	1.28
4#	2.04	2.01	2.14	24#	1.37	1.32	1.40
5#	2.53	2.67	2.57	25#	0.09	0.08	0.09
6#	2.79	2.99	2.81	26#	0.08	0.07	0.08
7#	1.04	1.13	1.11	27#	0.87	0.90	0.85
8#	1.16	1.08	1.13	28#	2.31	2.27	2.33
9#	1.21	1.17	1.24	29#	2.86	3.02	2.90
10#	1.80	1.73	1.79	30#	3.15	3.31	3.18
11#	1.93	2.03	1.86	31#	2.68	2.87	2.70
12#	0.77	0.80	0.75	32#	1.00	0.99	1.07
13#	0.59	0.54	0.57	33#	1.11	1.04	1.08
14#	0.10	0.09	0.09	34#	1.16	1.12	1.14
15#	0.06	0.07	0.06	35#	0.08	0.09	0.07
16#	0.42	0.40	0.43	36#	0.07	0.06	0.06
17#	0.09	0.10	0.08	37#	0.74	0.77	0.72
18#	0.07	0.08	0.07	38#	1.96	2.03	1.98
19#	1.44	1.40	1.48	39#	2.43	2.52	2.51
20#	1.93	2.00	2.01	40#	2.68	2.75	2.65

[0053] t 检验结果 : $t < 0.05$, $39 = 2.02$

[0054] 1、比浊法与横流法 40 例配对数据 t 检验结果 : $t = 1.90$ 。

[0055] 2、比浊法与直流法 40 例配对数据 t 检验结果 : $t = 1.92$ 。

[0056] 3、横流法与直流法 40 例配对数据 t 检验结果 : $t = 1.09$ 。

[0057] 结果显示 :3 组配对数据的 $t < t_{0.05, 39}$, 3 组配对数据的差异无显著性意义。本发明产品(胶体金横、直流法)与免疫增强散射比浊法(SIEMENS 公司产品)检测人人免疫球蛋白 G4 具有同等效果。

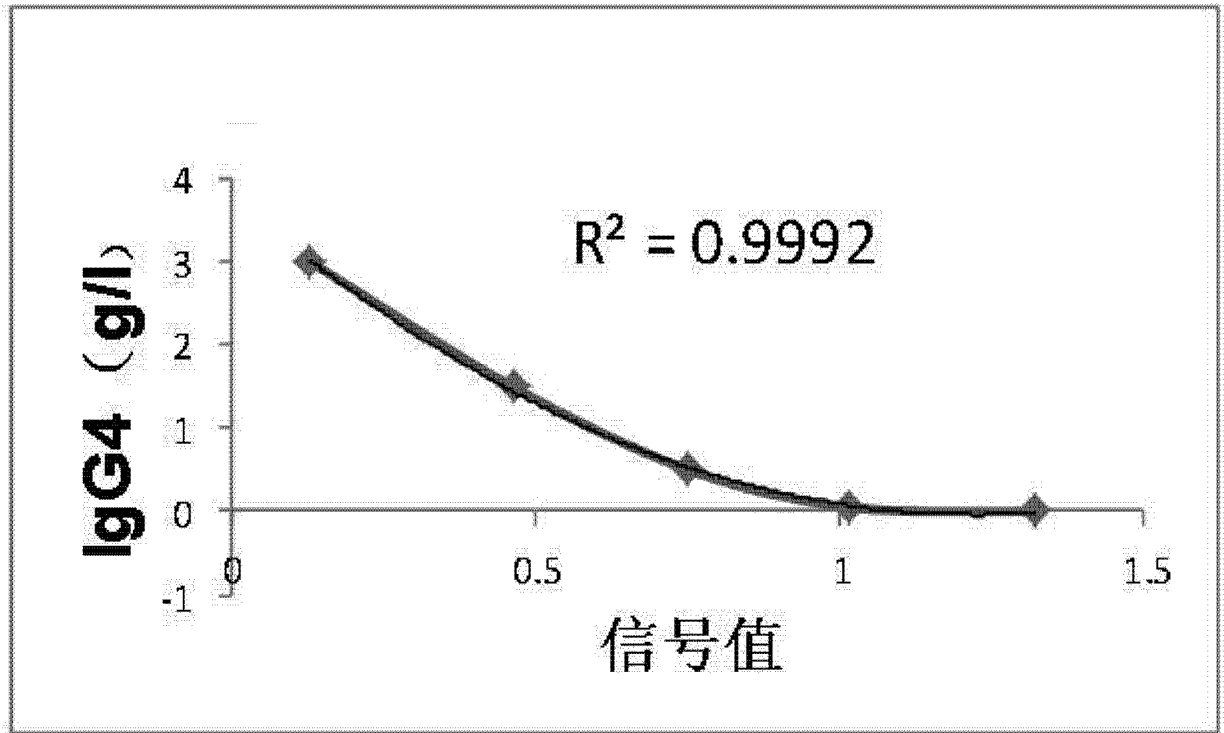


图 1

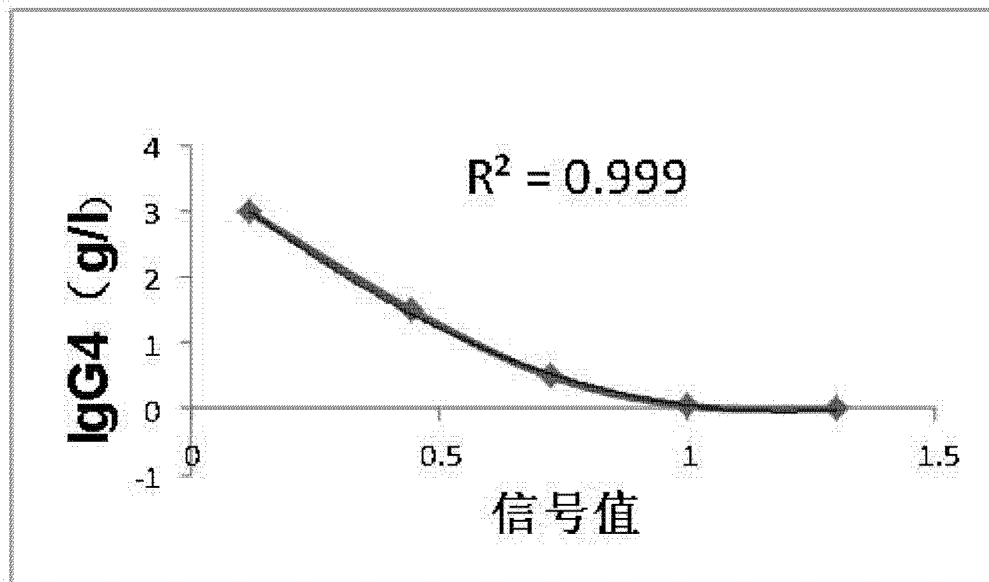


图 2

专利名称(译)	一种检测人免疫球蛋白G4的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103837686A	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201410079388.9	申请日	2014-03-06
[标]发明人	朱晓敏 王泉龙 张瑞镛 刘颖冰		
发明人	朱晓敏 王泉龙 张瑞镛 刘颖冰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N33/549		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/54366		
代理人(译)	林炜		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测人免疫球蛋白G4的试剂盒，包括一个固相载体，固相载体上结合有特异性抗人免疫球蛋白G4抗体或含有抗人免疫球蛋白G4抗体活性物质的蛋白，还包括一个胶体金标记的特异性抗人免疫球蛋白G4抗体或含有抗人免疫球蛋白G4抗体活性物质的蛋白。本发明还提供了上述试剂盒的制备方法。本发明是将特异性抗人免疫球蛋白G4抗体固相于载体，用以捕获人血清中的免疫球蛋白G4抗原，再将抗免疫球蛋白G4抗体胶体金标记物作为示踪物，如被测人血清中含有免疫球蛋白G4抗原，则固相载体呈红色斑点反应。本发明可以目测测量也可以使用仪器测量，检测样本可以是人的血清或血浆或全血。本发明可以作为快速检测人血清免疫球蛋白G4使用。

