



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103777007 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410033537. 8

(22) 申请日 2014. 01. 23

(71) 申请人 中国人民解放军第一一七医院

地址 310013 浙江省杭州市灵隐路 14 号解  
放军第 117 医院

(72) 发明人 成军 王国政 戴玉柱 孙长贵

陈达伟 江晓肖 马炬明 张益明

(74) 专利代理机构 浙江永鼎律师事务所 33233

代理人 王梨华 陈丽霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/564 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书17页

### (54) 发明名称

一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂

### (57) 摘要

本发明涉及医学检测领域,公开了一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:5.2g-7.7g 的硼砂、4.1g-6.1g 的硼酸、70g-90g 的聚乙二醇、6.2g-9.2g 的氯化钠、100  $\mu$  l-500  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。本发明利用该种免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,不仅建立了特异性检测 CIC 中抗原的标准操作流程,还建立了特异性检测 CIC 中抗体的标准操作流程,这是现有 CIC 检测方法都无法解决的问题。该种免疫复合物缓冲解离剂应用于患有感染性疾病、内分泌代谢性疾病、自身免疫性疾病、部分肿瘤疾病患者体液标本中 CIC 的检测。

1. 一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂,其特征在于:每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:5.2g-7.7g 的硼砂、4.1g-6.1g 的硼酸、70g-90g 的聚乙二醇、6.2g-9.2g 的氯化钠、100  $\mu$  l-500  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

2. 权利要求 1 所述的一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂,其特征在于:每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:5.5g-7.6g 的硼砂、4.5g-5.8g 的硼酸、78g-86g 的聚乙二醇、6.5g-9.0g 的氯化钠、110  $\mu$  l-490  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

3. 权利要求 1 所述的一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂,其特征在于:每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:6.4g-7.6g 的硼砂、5.1g-5.8g 的硼酸、80g-86g 的聚乙二醇、7.7g-9.0g 的氯化钠、200  $\mu$  l-490  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

4. 权利要求 1 所述的一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂,其特征在于:每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、80g 的聚乙二醇、7.7g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

## 一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测领域,尤其涉及一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂。

### 背景技术

[0002] 细菌、病毒等病原体侵入机体后或致敏物质(抗原,含自身抗原)刺激机体发生免疫应答,进而产生特异性免疫效应细胞或抗体,并与抗原发生特异性结合,所得到的复合物称为免疫复合物(又称抗原抗体复合物,immune complex,IC),主要有 IgG, IgM, IgA, IgE 型免疫复合物,其中以 IgG 和 IgM 最常见。由于抗原与抗体比例不同,所形成的 IC 分子大小各异,通常有三种形式:一是抗原抗体比例适当时,形成大分子的不溶性 IC(大于 19S),易被吞噬细胞捕获、吞噬和清除。二是抗原量过剩时,形成小分子的可溶性 IC(小于 6.6S),易透过肾小球滤过随尿排出体外。三是抗原量稍过剩时,形成中等大小的可溶性 IC(8.8-19S),它既不被吞噬细胞清除,又不能通过肾小球滤过排出,可较长时间游离于血液和其他体液中,又称循环免疫复合物(circulating immuno complex, CIC)。

[0003] 正常情况下,机体内的游离抗原与相应抗体结合形成 IC,可被机体的防御系统清除,作为清除异物抗原的一种方式,对机体有利。但在某些病理情况下,体内形成的 IC 不能被及时清除,可在局部沉积,通过激活补体,并在血小板、中性粒细胞等参与下,引起一系列连锁反应而导致组织损伤,出现临床症状,称为免疫复合物病(immune complex disease, ICD)。检查组织内或循环体液中 IC 的存在有助于某些疾病的诊断、发病机制的研究、预后评估、病情活动观察和疗效判断等。因此,准确、特异、灵敏检测免疫复合物对疾病的诊断、治疗和预后评估具有重要的临床意义, CIC 的检测日益受到重视。

[0004] 世界卫生组织(WHO)曾组织进行 CIC 检测方法学研究,发现尚无任何一种技术同时具备特异、灵敏、批量高效、重复性好的所有特点。由于方法的复杂性、敏感性和所检测 CIC 类型的局限性,目前的常用 CIC 检测技术均受到免疫复合物内免疫球蛋白种类及亚类、复合物大小、抗原与抗体比例、固定补体的能力等因素影响,在临床免疫学实验室应用受到很大限制。

### 发明内容

[0005] 本发明针对现有 CIC 检测技术及检测过程中,不能同时具备特异、灵敏、批量高效、重复性好、不受干扰的技术问题,公开了一种解决了以上技术问题的用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 分离剂。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明通过下述技术方案得以解决。

[0007] 一、针对 CIC 中抗原的部分:

[0008] 一种免疫复合物缓冲解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为, 135-165  $\mu$  l 的 CIC 分离剂、290-315  $\mu$  l 的 CIC 洗涤剂、5-16  $\mu$  l 的 CIC 复溶剂、65-76  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离剂和 65-76  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂。以制备的 HBsAg-抗-HBs

免疫复合物为例,本发明的试剂配方可以使CIC中的抗原解离率达到76.5%-83.8%(抗原解离率:指CIC解离后检测到的抗原量与实际CIC中抗原量的百分比)。而蛋白酶类消化法、强酸解离法、表面活性剂解离法的抗原解离率均在10%-20%以下。

[0009] 其中,每1L的CIC分离剂包括以下组分:5.2g-7.7g的硼砂、4.1g-6.1g的硼酸、70g-90g的聚乙二醇、6.2g-9.2g的氯化钠、100 $\mu$ l-500 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC分离剂的作用如下:当每1L的CIC分离剂中包括5.2g-7.7g的硼砂、4.1g-6.1g的硼酸、70g-90g的聚乙二醇、6.2g-9.2g的氯化钠、100 $\mu$ l-500 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水时,分离CIC效果比较理想,同时改用氯化钠也可避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗原的干扰。本发明采用的聚乙二醇,作为优选选用聚乙二醇6000;本发明中提到的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0010] 作为优选,每1L的CIC分离剂包括以下组分:5.5g-7.6g的硼砂、4.5g-5.8g的硼酸、78g-86g的聚乙二醇、6.5g-9.0g的氯化钠、110 $\mu$ l-490 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。该配方的CIC分离剂,使分离CIC效果比较理想,同时改用氯化钠也可避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗原的干扰。本发明中提到的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0011] 作为优选,每1L的CIC分离剂包括以下组分:6.4g-7.6g的硼砂、5.1g-5.8g的硼酸、80g-86g的聚乙二醇、7.7g-9.0g的氯化钠、200 $\mu$ l-490 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。该配方的CIC分离剂,使分离CIC效果比较理想,同时改用氯化钠也可避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗原的干扰。发明中提到的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0012] 作为优选,每1L的CIC分离剂包括以下组分:6.4g的硼砂、5.1g的硼酸、80g的聚乙二醇、7.7g的氯化钠、200 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。该配方的CIC分离剂,使分离CIC的达到最大量,同时改用氯化钠也最大化避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗原的干扰。发明中提到的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0013] 每1L的CIC洗涤剂包括以下组分:5.2g-7.7g的硼砂、4.1g-6.1g的硼酸、35g-45g的聚乙二醇、8.0g-11.7g的氯化钠、100 $\mu$ l-500 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。以上配方的CIC洗涤剂主要针对CIC分离剂的配方进行设计,其作用是洗去体液标本中多余的杂蛋白。本发明采用的聚乙二醇,作为优选选用聚乙二醇6000;发明中提到的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0014] 每1L的CIC复溶剂包括以下组分:8.0g-9.5g的氯化钠、0.01g-0.03g的氢氧化钠、50 $\mu$ l-500 $\mu$ l的聚乙二醇辛基苯基醚、100 $\mu$ l-500 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC复溶剂针对解离时的缓冲量大小而设计,以上配方的CIC复溶剂对分离CIC的损伤程度最小;采用等渗的聚乙二醇辛基苯基醚,低浓度的聚乙二醇辛基苯基醚协助溶解CIC;本发明所采用的聚乙二醇辛基苯基醚又叫Triton X-100,发明中提到的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0015] 每1L的CIC抗原缓冲液解离剂包括以下组分:3.5g-5.5g的甘氨酸、9.0ml-15.0ml质量分数为35%-37%的浓盐酸、0.35g-0.51g的氯化钠、100 $\mu$ l-500 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC抗原缓冲液解离剂使CIC中抗原达到最大程度的解离。如以制备的HBsAg-抗-HBs免疫复合物为参照,抗原解离率达到76.5%-83.8%。发明中提到

的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0016] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂包括以下组分：16g-24g 的氨基丁三醇、5.7g-8.6g 的氯化钠、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC 抗原缓冲液解离中和剂主要是对 CIC 解离后的抗原缓冲液解离剂进行中和，使渗透压、pH 达到抗原的最适环境，以利于对抗原的检测。发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0017] 以上提到的该种免疫复合物缓冲液解离剂应用于患有感染性疾病、内分泌代谢性疾病、自身免疫性疾病、部分肿瘤疾病患者的血清、胸腹水、尿液、脑脊液、关节腔液的 CIC 中抗原的检测。感染性疾病、内分泌代谢性疾病、自身免疫性疾病、部分肿瘤疾病等患者的血清、胸腹水、尿液、脑脊液、关节腔液等体液标本中是否存在相应 CIC，我们可以通过分离 CIC，从而推断患者血清、胸腹水、尿液、脑脊液、关节腔液等体液中是否存在相应特异性标志物的 CIC 以及含量高低，以了解 CIC 在上述疾病发生发展过程中的病理生理作用及相关性；相关标志物阴性体液标本中若检测到相应 CIC 中的抗原或抗体（通常情况下，抗原解离率高于抗体解离率），则能提高该标志物的检出率及对相应疾病的诊断灵敏度。

[0018] 一种利用以上提到的免疫复合物缓冲液解离剂检测 CIC 的方法，检测 CIC 中抗原的方法，以 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物为例，由下述步骤组成，

[0019] A. 分离：向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 含有 CIC 的待测样本，再分别加入 135-165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂；混匀后，在 37℃ 放置 30min，进行离心，离心结束后弃去上清液；

[0020] B. 洗涤：向两支离心管中，分别加入 290-315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂，离心后，弃去上清液，并将 CIC 沉淀物沥干；

[0021] C. 复溶：分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中，加入 5-16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂，离心管安装于振荡器上，振荡至溶液中无块状沉淀物；

[0022] D. 空白样品检测：将一支离心管标记为空白样品管，并加入 65-76  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂和 65-76  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离中和剂，混匀后检测 HBsAg，将检测结果作为空白值；

[0023] E. CIC 抗原解离：将另一支离心管标记为测定样品管，并加入 65-76  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂，在 56℃ 空气孵育放置 30min 或在 42℃ 水浴放置 30min，得到解离液；

[0024] F. CIC 抗原解离中和：向步骤 E 中得到的解离液中，加入 65-76  $\mu$ l 抗原缓冲液解离中和剂，混匀后检测 HBsAg，将检测结果作为测定值。

[0025] HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物解离后抗原检测结果判断标准，如下表所示：

[0026] 表 1 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物解离后抗原检测结果判断标准

[0027]

空白值 (IU/ml)	测定值 (IU/ml)	结 果
<Cutoff	>Cutoff	样本中存在 CIC，具体含量以测定值大小判断
<Cutoff	<Cutoff	样本中不存在 CIC
>Cutoff	>Cutoff	若测定值>130%空白值，则样本中存在 CIC，具体含量以(测定值-空白值)差值大小判断，反之则判为不存在 CIC
>Cutoff	<Cutoff	此类型结果模式不存在，或操作误差

[0028] 注：在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测（化学发光法），Cutoff 值 =0.05IU/ml

[0029] 该种利用免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法通过分离、洗涤、复溶、解离 CIC、中和，然后采用（电）化学发光法、免疫印迹试验、酶联免疫吸附试验等临床免疫学实验室常规方法进行特异灵敏、定量或半定量检测抗原，整个实验流程充分考虑到温度、渗透压、pH 环境对 CIC、抗原、抗体的影响，建立了特异性检测 CIC 中抗原（解离后）的标准操作流程，这是目前现有 CIC 检测方法都无法解决的问题。

[0030] 二、针对 CIC 中抗体的部分：

[0031] 一种免疫复合物缓冲解离剂，以如下体积比例配比计，各组分及含量为，135-165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂、290-315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂、5-16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂、65-76  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离剂和 65-76  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂。以制备的 HBsAg- 抗 HBs 免疫复合物为例，本发明的试剂配方可以使 CIC 中的抗体解离率达到 37.5%-51.0%（抗体解离率：指 CIC 解离后检测到的抗体与实际 CIC 中抗体量的百分比）。而现有的 CIC 检测技术因为抗体被破坏或一些干扰因素的存在，无法检测 CIC 中的抗体。

[0032] 其中，每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分：5.2g-7.7g 的硼砂、4.1g-6.1g 的硼酸、70g-90g 的聚乙二醇、6.2g-9.2g 的氯化钠、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC 分离剂的作用如下：当每 1L 的 CIC 分离剂中包括 5.2g-7.7g 的硼砂、4.1g-6.1g 的硼酸、70g-90g 的聚乙二醇、6.2g-9.2g 的氯化钠、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水时，被分离的 CIC 达到最大量，同时改用氯化钠也避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗体的干扰。本发明采用的聚乙二醇，作为优选选用聚乙二醇 6000；本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0033] 作为优选，每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分：5.5g-7.6g 的硼砂、4.5g-5.8g 的硼酸、78g-86g 的聚乙二醇、6.5g-9.0g 的氯化钠、110  $\mu$ l-490  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。该配方的 CIC 分离剂，使分离 CIC 效果比较理想，同时改用氯化钠也可避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗体的干扰。本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0034] 作为优选，每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分：6.4g-7.6g 的硼砂、5.1g-5.8g 的硼酸、80g-86g 的聚乙二醇、7.7g-9.0g 的氯化钠、200  $\mu$ l-490  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。该配方的 CIC 分离剂，使分离 CIC 效果比较理想，同时改用氯化钠也可避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗体的干扰。本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0035] 作为优选,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、80g 的聚乙二醇、7.7g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。该配方的 CIC 分离剂,使分离 CIC 的达到最大量,同时改用氯化钠也最大化避免了传统沉淀方法中氟化钠残留对后续检测抗体的干扰。本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0036] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分:5.2g-7.7g 的硼砂、4.1g-6.1g 的硼酸、35g-45g 的聚乙二醇、8.0g-11.7g 的氯化钠、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。以上配方的 CIC 洗涤剂主要针对 CIC 分离剂的配方进行设计,其作用是洗去体液标本中多余的杂蛋白。本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0037] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分:8.0g-9.5g 的氯化钠、0.01g-0.03g 的氢氧化钠、50  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的聚乙二醇辛基苯基醚、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC 复溶剂针对解离时的缓冲量大小而设计,以上配方的 CIC 复溶剂对分离 CIC 的损伤程度最小;采用等渗的聚乙二醇辛基苯基醚,低浓度的聚乙二醇辛基苯基醚协助溶解 CIC。本发明所采用的聚乙二醇辛基苯基醚又叫 Triton X-100,本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0038] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离剂包括以下组分:3.5g-5.5g 的甘氨酸、4.0ml-6.0ml 质量分数为 35%-37% 的浓盐酸、4.4g-6.6g 的氯化钠、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC 抗体缓冲液解离剂使 CIC 中抗体达到最大程度的解离。如以制备的 HBsAg-抗-HBs 免疫复合物为参照,抗体解离率达到 37.5%-51.0%。本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0039] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂包括以下组分:6.8g-10.0g 的氨基丁三醇、6.5g-9.6g 的氯化钠、100  $\mu$ l-500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。CIC 抗体缓冲液解离中和剂主要是对 CIC 解离的抗体缓冲液解离剂进行中和,使渗透压、pH 达到抗体的最适环境,以利于对抗体的检测。本发明中提到的液体生物防腐剂为 Proclin-300。

[0040] 以上提到的该种免疫复合物缓冲解离剂应用于患有感染性疾病、内分泌代谢性疾病、自身免疫性疾病、部分肿瘤疾病患者的血清、胸腹水、尿液、脑脊液、关节腔液的 CIC 中抗体的检测。感染性疾病、内分泌代谢性疾病、自身免疫性疾病、部分肿瘤疾病等患者的血清、胸腹水、尿液、脑脊液、关节腔液等体液中是否存在相应 CIC,我们可以通过分离 CIC,从而推断患者血清、胸腹水、尿液、脑脊液、关节腔液等体液中是否存在相应特异性标志物的 CIC 以及含量高低,以了解 CIC 在上述疾病发生发展过程中的病理生理作用及相关性;相关标志物阴性体液标本中若检测到相应 CIC 中的抗原或抗体(通常情况下,抗原解离率高于抗体解离率),则能提高该标志物的检出率及对相应疾病的诊断灵敏度。

[0041] 一种利用以上的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗体的方法,以 HBsAg-抗-HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成,

[0042] A. 分离:向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 含有 CIC 的待测样本,再分别加入 135-165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂;混匀后,在 37℃ 放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液;

[0043] B. 洗涤:向两支离心管中,分别加入 290-315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干;

[0044] C. 复溶:分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 5-16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物;

[0045] D. 空白样品检测 :将一支离心管标记为空白样品管,并加入 65-76  $\mu$  l 的抗体缓冲液解离剂和 65-76  $\mu$  l 的抗体缓冲液解离中和剂,混匀后检测抗-HBs,将检测结果作为空白值;

[0046] E. CIC 抗体解离 :将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 65-76  $\mu$  l 抗体缓冲液解离剂,在 15℃放置 30min,得到解离液;

[0047] F. CIC 抗体解离中和 :向步骤 E 中得到的解离液中,加入 65-76  $\mu$  l 抗体缓冲液解离中和剂,混匀后检测抗-HBs,将检测结果作为测定值。

[0048] HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物解离后抗体检测结果判断标准,如下表所示:

[0049] 表 2HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物解离后抗体检测结果判断标准

[0050]

空白值(mIU/ml)	测定值(mIU/ml)	结果
-------------	-------------	----

[0051]

<Cutoff	>Cutoff	样本中存在 CIC, 具体含量以测定值大小判断
<Cutoff	<Cutoff	样本中不存在 CIC
>Cutoff	>Cutoff	若测定值>130%空白值, 则样本中存在 CIC, 具体含量以(测定值-空白值)差值大小判断, 反之则判为不存在 CIC
>Cutoff	<Cutoff	此类型结果模式不存在, 或操作误差

[0052] 注 :在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测 (化学发光法), Cutoff 值 =10mIU/ml

[0053] 该种利用免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法通过分离、洗涤、复溶、解离 CIC、中和,然后采用 (电) 化学发光法、免疫印迹试验、酶联免疫吸附试验等临床免疫学实验室常规方法进行特异灵敏、定量或半定量检测抗体,整个实验流程充分考虑到温度、渗透压、pH 环境对 CIC、抗原、抗体的影响,建立了特异性检测 CIC 中抗体 (解离后) 的标准操作流程,这是目前现有 CIC 检测方法都无法解决的问题。

[0054] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0055] (1) 本发明改进了现有技术中,CIC 检测技术特异性差的缺点。直接检测 CIC 中的抗原或抗体。

[0056] (2) 本发明改进了现有技术中, CIC 检测技术灵敏度低的缺点,通过免疫复合物缓冲解离剂解离 CIC 中的抗原或抗体,再通过特异性检测 CIC 中的抗原或抗体,使抗原、抗体检测结果达到 ng/ml 和 mIU/ml 的水平,从而精确地计算 CIC 含量。

[0057] (3) 本发明重复性好,适合批量使用,提高了工作效率。重复性与临床免疫学实验室常规检测抗原或抗体的变异度相当,一次解离可利用多种方法检测多个项目。

[0058] (4) 本发明解决了现有 CIC 检测技术不能同时具备特异、灵敏、批量高效、重复性好的问题。本发明既可以特异灵敏定量检测 CIC 中的抗原或抗体;又可以对多份体液标本中同一种 CIC 进行批量检测 (如同时检测多份血清标本中的 HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物);还可以对同一份体液标本中多种 CIC 进行高效检测 (如对同一份血清标本中的



HBsAg-抗-HBs、HBeAg-抗-HBe、HCV-cAg-抗-HCV、HIV-P24-抗-HIV等免疫复合物,或IgM、IgG、IgA型免疫复合物进行同时检测)。此外,本发明不需要特殊的仪器设备,适用于临床免疫学实验室常规的抗原、抗体检测项目;真正做到一次解离,同时检测多个项目,重复性(CV值)达到15%-20%以下。

[0059] (5) 本发明消除了现有CIC检测技术中抗原或抗体检测过程中的干扰物质。本发明通过使用CIC抗体缓冲液解离中和剂,保障了抗原或抗体检测过程中没有任何物质干扰检测结果。

[0060] (6) 本发明改进了蛋白酶类消化法、强酸解离法、表面活性剂解离法仅能检测游离抗原或抗体阴性标本的缺点。本发明对游离抗原或抗体无论是阴性还是阳性的标本均适用,本发明通过将CIC从体液标本中分离出来,避免了体液标本中游离抗原或抗体阳性对分离CIC中的抗原或抗体检测的干扰。

[0061] (7) 本发明避免了渗透压、pH对抗原抗体检测的影响。本发明使检测体系的渗透压、pH值处于抗原或抗体的最适环境,从而避免了渗透压、pH对抗原抗体检测的影响。

[0062] (8) 本发明适用于低浓度CIC的检测。本发明可以通过CIC分离、调整解离体积达到浓缩CIC的目的,从而大大提高了CIC中抗原或抗体的检出率。

[0063] (9) 本发明也涉及利用上述免疫复合物缓冲解离剂检测CIC的方法,通过分离、洗涤、复溶、解离CIC、中和,最后检测样品中的CIC。不仅建立了特异性检测CIC中抗原(解离后)的标准操作流程,还建立了特异性检测CIC中抗体(解离后)的标准操作流程,这是目前现有CIC检测方法都无法解决的问题。

[0064] (10) 本发明适合在临床免疫学实验室常规检测。标本处理相对简便,是目前现有CIC检测技术中操作比较方便、能在临床实验室普及、对疾病诊断最有价值的方法。

## 具体实施方式

### [0065] 实施例1

[0066] 一种免疫复合物缓冲解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,135 $\mu$ l的CIC分离剂、290 $\mu$ l的CIC洗涤剂、5 $\mu$ l的CIC复溶剂、65 $\mu$ l的CIC抗原缓冲液解离剂和65 $\mu$ l的CIC抗原缓冲液解离中和剂。

[0067] 其中,每1L的CIC分离剂包括以下组分:5.2g的硼砂、4.1g的硼酸、70g的聚乙二醇、6.2g的氯化钠、100 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0068] 每1L的CIC洗涤剂包括以下组分:5.2g的硼砂、4.1g的硼酸、35g的聚乙二醇、8.0g的氯化钠、100 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0069] 每1L的CIC复溶剂包括以下组分:8.0g的氯化钠、0.01g的氢氧化钠、50 $\mu$ l的聚乙二醇辛基苯基醚、100 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0070] 每1L的CIC抗原缓冲液解离剂包括以下组分:3.5g的甘氨酸、9.0ml质量分数为35%的浓盐酸、0.35g的氯化钠、100 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0071] 每1L的CIC抗原缓冲液解离中和剂包括以下组分:16g的氨基丁三醇、5.7g的氯化钠、100 $\mu$ l的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0072] 一种利用以上提到的免疫复合物缓冲解离剂检测CIC的方法,检测CIC中抗原的方法,以HBsAg-抗-HBs免疫复合物为例,由下述步骤组成。

[0073] A. 分离:向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 待测胸腹水样本,再分别加入 135  $\mu$ l 的 CIC 分离剂;混匀后,在 37℃放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液;

[0074] B. 洗涤:向两支离心管中,分别加入 290  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干;

[0075] C. 复溶:分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 5  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物;

[0076] D. 空白样品检测:将一支离心管标记为空白样品管,并加入 65  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂和 65  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为空白值;

[0077] E. CIC 抗原解离:将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 65  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂,在 56℃空气孵育放置 30min,得到解离液;

[0078] F. CIC 抗原解离中和:向步骤 E 中得到的解离液中,加入 65  $\mu$ l 抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为测定值。

[0079] 待测胸腹水样本的测试结果:测得的空白值 <Cutoff,测定值 >Cutoff。即待测胸腹水样本中存在 CIC,具体含量根据测定值大小判断。[注:在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测(化学发光法),Cutoff 值 =0.05IU/ml]。

#### [0080] 实施例 2

[0081] 一种免疫复合物缓冲解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂、315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂、16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂、76  $\mu$ l 的 CIC 抗原缓冲液解离剂和 76  $\mu$ l 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂。

[0082] 其中,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:7.7g 的硼砂、6.1g 的硼酸、90g 的聚乙二醇、9.2g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0083] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分:7.7g 的硼砂、6.1g 的硼酸、45g 的聚乙二醇、11.7g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0084] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分:9.5g 的氯化钠、0.03g 的氢氧化钠、500  $\mu$ l 的聚乙二醇辛基苯基醚、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0085] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离剂包括以下组分:5.5g 的甘氨酸、15.0ml 质量分数为 37% 的浓盐酸、0.51g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0086] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂包括以下组分:24g 的氨基丁三醇、8.6g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0087] 一种利用以上提到的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗原的方法,以 HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成。

[0088] A. 分离:向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 待测脑脊液样本,再分别加入 165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂;混匀后,在 37℃放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液;

[0089] B. 洗涤:向两支离心管中,分别加入 315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干;

[0090] C. 复溶:分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物;

[0091] D. 空白样品检测:将一支离心管标记为空白样品管,并加入 76  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂和 76  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为空白值;

[0092] E. CIC 抗原解离 :将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 76  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离剂,42℃水浴放置 30min,得到解离液 ;

[0093] F. CIC 抗原解离中和 :向步骤 E 中得到的解离液中,加入 76  $\mu$  l 抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为测定值。

[0094] 待测脑脊液样本的测试结果 :测得的空白值 <Cutoff,测定值 <Cutoff。即待测脑脊液样本中不存在 CIC。[注 :在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测 (化学发光法),Cutoff 值 =0.05IU/ml]。

[0095] 实施例 3

[0096] 一种免疫复合物缓冲解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,150  $\mu$  l 的 CIC 分离剂、300  $\mu$  l 的 CIC 洗涤剂、10  $\mu$  l 的 CIC 复溶剂、70  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离剂和 70  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂。

[0097] 其中,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分 :6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、80g 的聚乙二醇、7.7g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0098] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分 :6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、40g 的聚乙二醇、9.9g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0099] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分 :9.0g 的氯化钠、0.016g 的氢氧化钠、300  $\mu$  l 的聚乙二醇辛基苯基醚、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0100] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离剂包括以下组分 :4.5g 的甘氨酸、12ml 质量分数为 36% 的浓盐酸、0.43g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0101] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂包括以下组分 :20g 的氨基丁三醇、7.3g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0102] 一种利用以上提到的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗原的方法,以 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成。

[0103] 一种利用上述所述的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,其特征在于 :检测 CIC 中抗原的方法,由下述步骤组成。

[0104] A. 分离 :向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$  l 待测样本,再分别加入 150  $\mu$  l 的 CIC 分离剂 ;混匀后,在 37℃放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液 ;

[0105] B. 洗涤 :向两支离心管中,分别加入 300  $\mu$  l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干 ;

[0106] C. 复溶 :分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 10  $\mu$  l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物 ;

[0107] D. 空白样品检测 :将一支离心管标记为空白样品管,并加入 70  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离剂和 70  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为空白值 ;

[0108] E. CIC 抗原解离 :将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 70  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离剂,42℃水浴放置 30min,得到解离液 ;

[0109] F. CIC 抗原解离中和 :向步骤 E 中得到的解离液中,加入 70  $\mu$  l 抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为测定值。

[0110] 待测样本的测试结果 :测得的空白值 >Cutoff,测定值 >Cutoff,且测定值 <130% 空白值。即待测样本中不存在 CIC。[注 :在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测 (化学发光

法), Cutoff 值 =0.05IU/ml]。

#### [0111] 实施例 4

[0112] 一种免疫复合物缓冲解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,150  $\mu$  l 的 CIC 分离剂、300  $\mu$  l 的 CIC 洗涤剂、10  $\mu$  l 的 CIC 复溶剂、70  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离剂和 70  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂。

[0113] 其中,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:5.5g 的硼砂、4.5g 的硼酸、78g 的聚乙二醇、6.5g 的氯化钠、110  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0114] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分:6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、40g 的聚乙二醇、9.9g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0115] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分:9.0g 的氯化钠、0.016g 的氢氧化钠、300  $\mu$  l 的聚乙二醇辛基苯基醚、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0116] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离剂包括以下组分:4.5g 的甘氨酸、12ml 质量分数为 36% 的浓盐酸、0.43g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0117] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂包括以下组分:20g 的氨基丁三醇、7.3g 的氯化钠、200  $\mu$  l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0118] 一种利用以上提到的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗原的方法,以 HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成。

[0119] 一种利用根据权利要求 3 所述的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法,其特征在于:检测 CIC 中抗原的方法,由下述步骤组成。

[0120] A. 分离:向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$  l 待测样本,再分别加入 150  $\mu$  l 的 CIC 分离剂;混匀后,在 37℃ 放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液;

[0121] B. 洗涤:向两支离心管中,分别加入 300  $\mu$  l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干;

[0122] C. 复溶:分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 10  $\mu$  l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物;

[0123] D. 空白样品检测:将一支离心管标记为空白样品管,并加入 70  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离剂和 70  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为空白值;

[0124] E. CIC 抗原解离:将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 70  $\mu$  l 的抗原缓冲液解离剂,在 56℃ 空气孵育放置 30min,得到解离液;

[0125] F. CIC 抗原解离中和:向步骤 E 中得到的解离液中,加入 70  $\mu$  l 抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为测定值。

[0126] 待测样本的测试结果:测得的空白值 >Cutoff,测定值 >Cutoff,且测定值 <130% 空白值。即待测样本中不存在 CIC。[注:在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测(化学发光法),Cutoff 值 =0.05IU/ml]。

#### [0127] 实施例 5

[0128] 一种免疫复合物缓冲解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,150  $\mu$  l 的 CIC 分离剂、300  $\mu$  l 的 CIC 洗涤剂、10  $\mu$  l 的 CIC 复溶剂、70  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离剂和 70  $\mu$  l 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂。

[0129] 其中,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分:7.6g 的硼砂、5.8g 的硼酸、86g 的聚乙二

醇、9.0g 的氯化钠、490  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0130] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分 :6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、40g 的聚乙二醇、9.9g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0131] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分 :9.0g 的氯化钠、0.016g 的氢氧化钠、300  $\mu$ l 的聚乙二醇辛基苯基醚、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0132] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离剂包括以下组分 :4.5g 的甘氨酸、12ml 质量分数为 36% 的浓盐酸、0.43g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0133] 每 1L 的 CIC 抗原缓冲液解离中和剂包括以下组分 :20g 的氨基丁三醇、7.3g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0134] 一种利用以上提到的免疫复合物缓冲液解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗原的方法,以 HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成。

[0135] 一种利用根据权利要求 3 所述的免疫复合物缓冲液解离剂检测 CIC 的方法,其特征在于:检测 CIC 中抗原的方法,由下述步骤组成。

[0136] A. 分离:向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 待测样本,再分别加入 150  $\mu$ l 的 CIC 分离剂;混匀后,在 37 $^{\circ}$ C 放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液;

[0137] B. 洗涤:向两支离心管中,分别加入 300  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干;

[0138] C. 复溶:分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 10  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物;

[0139] D. 空白样品检测:将一支离心管标记为空白样品管,并加入 70  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂和 70  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为空白值;

[0140] E. CIC 抗原解离:将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 70  $\mu$ l 的抗原缓冲液解离剂,在 56 $^{\circ}$ C 空气孵育放置 30min,得到解离液;

[0141] F. CIC 抗原解离中和:向步骤 E 中得到的解离液中,加入 70  $\mu$ l 抗原缓冲液解离中和剂,混匀后检测 HBsAg,将检测结果作为测定值。

[0142] 待测样本的测试结果:测得的空白值 >Cutoff,测定值 >Cutoff,且测定值 <130% 空白值。即待测样本中不存在 CIC。[注:在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测(化学发光法),Cutoff 值 =0.05IU/ml]。

[0143] 实施例 6

[0144] 一种免疫复合物缓冲液解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,135  $\mu$ l 的 CIC 分离剂、290  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂、5  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂、65  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离剂和 65  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂。

[0145] 其中,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分 :5.2g 的硼砂、4.1g 的硼酸、70g 的聚乙二醇、6.2g 的氯化钠、100  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0146] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分 :5.2g 的硼砂、4.1g 的硼酸、35g 的聚乙二醇、8.0g 的氯化钠、100  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0147] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分 :8.0g 的氯化钠、0.01g 的氢氧化钠、50  $\mu$ l 的聚乙二醇辛基苯基醚、100  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0148] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离剂包括以下组分 :3.5g 的甘氨酸、4.0ml 质量分数为

35%的浓盐酸、4.4g的氯化钠、100  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0149] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂包括以下组分 :6.8g 的氨基丁三醇、6.5g 的氯化钠、100  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0150] 一种利用以上的免疫复合物缓冲液解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗体的方法,以 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成。

[0151] A. 分离 :向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 待测样本,再分别加入 135  $\mu$ l 的 CIC 分离剂 ;混匀后,在 37℃ 放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液 ;

[0152] B. 洗涤 :向两支离心管中,分别加入 290  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,并将 CIC 沉淀物沥干 ;

[0153] C. 复溶 :分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中,加入 5  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂,离心管安装于振荡器上,振荡至溶液中无块状沉淀物 ;

[0154] D. 空白样品检测 :将一支离心管标记为空白样品管,并加入 65  $\mu$ l 的抗体缓冲液解离剂和 65  $\mu$ l 的抗体缓冲液解离中和剂,混匀后检测抗 -HBs,将检测结果作为空白值 ;

[0155] E. CIC 抗体解离 :将另一支离心管标记为测定样品管,并加入 65  $\mu$ l 抗体缓冲液解离剂,在 15℃ 放置 30min,得到解离液 ;

[0156] F. CIC 抗体解离中和 :向步骤 E 中得到的解离液中,加入 65  $\mu$ l 抗体缓冲液解离中和剂,混匀后检测抗 -HBs,将检测结果作为测定值。

[0157] 待测样本的测试结果 :测得的空白值 >Cutoff,测定值 >Cutoff,且测定值 <130% 空白值。即待测样本中不存在 CIC。[注 :在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测 (化学发光法),Cutoff 值 =10mIU/ml]。

[0158] 实施例 7

[0159] 一种免疫复合物缓冲液解离剂,以如下体积比例配比计,各组分及含量为,165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂、315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂、16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂、76  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离剂和 76  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂。

[0160] 其中,每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分 :7.7g 的硼砂、6.1g 的硼酸、90g 的聚乙二醇、9.2g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0161] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分 :7.7g 的硼砂、6.1g 的硼酸、45g 的聚乙二醇、11.7g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0162] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分 :9.5g 的氯化钠、0.03g 的氢氧化钠、500  $\mu$ l 的聚乙二醇辛基苯基醚、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0163] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离剂包括以下组分 :5.5g 的甘氨酸、6.0ml 质量分数为 37% 的浓盐酸、6.6g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0164] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂包括以下组分 :10.0g 的氨基丁三醇、9.6g 的氯化钠、500  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0165] 一种利用以上的免疫复合物缓冲液解离剂检测 CIC 的方法,检测 CIC 中抗体的方法,以 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物为例,由下述步骤组成,

[0166] A. 分离 :向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 待测样本,再分别加入 165  $\mu$ l 的 CIC 分离剂 ;混匀后,在 37℃ 放置 30min,进行离心,离心结束后弃去上清液 ;

[0167] B. 洗涤 :向两支离心管中,分别加入 315  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂,离心后,弃去上清液,

并将 CIC 沉淀物沥干；

[0168] C. 复溶：分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中，加入 16  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂，离心管安装于振荡器上，振荡至溶液中无块状沉淀物；

[0169] D. 空白样品检测：将一支离心管标记为空白样品管，并加入 76  $\mu$ l 的抗体缓冲液解离剂和 76  $\mu$ l 的抗体缓冲液解离中和剂，混匀后检测抗-HBs，将检测结果作为空白值；

[0170] E. CIC 抗体解离：将另一支离心管标记为测定样品管，并加入 76  $\mu$ l 抗体缓冲液解离剂，在 15℃放置 30min，得到解离液；

[0171] F. CIC 抗体解离中和：向步骤 E 中得到的解离液中，加入 76  $\mu$ l 抗体缓冲液解离中和剂，混匀后检测抗-HBs，将检测结果作为测定值。

[0172] 待测样本的测试结果：测得的空白值 <Cutoff，测定值 >Cutoff。即待测样本中存在 CIC。[注：在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测（化学发光法），Cutoff 值=10mIU/ml]。

[0173] 实施例 8

[0174] 一种免疫复合物缓冲解离剂，以如下体积比例配比计，各组分及含量为，150  $\mu$ l 的 CIC 分离剂、300  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂、10  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂、70  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离剂和 70  $\mu$ l 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂。

[0175] 其中，每 1L 的 CIC 分离剂包括以下组分：6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、80g 的聚乙二醇、7.7g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0176] 每 1L 的 CIC 洗涤剂包括以下组分：6.4g 的硼砂、5.1g 的硼酸、40g 的聚乙二醇、9.9g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0177] 每 1L 的 CIC 复溶剂包括以下组分：9.0g 的氯化钠、0.016g 的氢氧化钠、300  $\mu$ l 的聚乙二醇辛基苯基醚、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0178] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离剂包括以下组分：4.5g 的甘氨酸、5.0ml 质量分数为 36% 的浓盐酸、5.5g 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0179] 每 1L 的 CIC 抗体缓冲液解离中和剂包括以下组分：8.4g 的氨基丁三醇、8.0 的氯化钠、200  $\mu$ l 的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。

[0180] 一种利用以上的免疫复合物缓冲解离剂检测 CIC 的方法，检测 CIC 中抗体的方法，以 HBsAg- 抗-HBs 免疫复合物为例，由下述步骤组成，

[0181] A. 分离：向 2 支 1ml 的离心管分别加入 150  $\mu$ l 待测样本，再分别加入 150  $\mu$ l 的 CIC 分离剂；混匀后，在 37℃放置 30min，进行离心，离心结束后弃去上清液；

[0182] B. 洗涤：向两支离心管中，分别加入 300  $\mu$ l 的 CIC 洗涤剂，离心后，弃去上清液，并将 CIC 沉淀物沥干；

[0183] C. 复溶：分别向含有沥干的 CIC 沉淀物的离心管中，加入 10  $\mu$ l 的 CIC 复溶剂，离心管安装于振荡器上，振荡至溶液中无块状沉淀物；

[0184] D. 空白样品检测：将一支离心管标记为空白样品管，并加入 70  $\mu$ l 的抗体缓冲液解离剂和 70  $\mu$ l 的抗体缓冲液解离中和剂，混匀后检测抗-HBs，将检测结果作为空白值；

[0185] E. CIC 抗体解离：将另一支离心管标记为测定样品管，并加入 70  $\mu$ l 抗体缓冲液解离剂，在 15℃放置 30min，得到解离液；

[0186] F. CIC 抗体解离中和：向步骤 E 中得到的解离液中，加入 70  $\mu$ l 抗体缓冲液解离中和剂，混匀后检测抗-HBs，将检测结果作为测定值。

[0187] 待测样本的测试结果：测得的空白值 <Cutoff, 测定值 <Cutoff。即待测样本中不存在 CIC。[注：在美国雅培 i2000 免疫分析仪上检测（化学发光法），Cutoff 值 = 10mIU/ml]。

[0188] 实施例 9

[0189] 1. 采用实施例 3 所述的免疫复合物缓冲解离剂与表面活性剂解离法检测 HCV-Ag- 抗 -HCV 免疫复合物的结果比较

[0190] 随机收集日常工作中 ELISA 检测血清抗 -HCV 阳性标本共 22 份，分别采用实施例 3 所述的检测 CIC 的方法和表面活性剂解离技术对 22 份血清标本进行解离，然后采用 ELISA 法 HCV-Ag 试剂盒同时检测 HCV-Ag，结果见表 3。

[0191] 表 3 实施例 3 对丙肝患者 CIC 中的 HCV-Ag 检测结果 (n=22)

[0192]

方法	阳性数	阳性率(%)	OD 值( $\bar{x} \pm s$ , A)
实施例 3	13	59.1	0.635±0.389
表面活性剂解离法	8	36.4	0.476±0.302

[0193] 2. 采用实施例 3 所述的免疫复合物缓冲解离剂与强酸解离法、胃蛋白酶消化法检测 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物的结果比较

[0194] 随机收集日常工作中 ELISA 检测急性乙肝病人刚进入恢复期（血清 HBsAg 阴性，抗 -HBe 和抗 -HBc 阳性，抗 -HBs 弱阳性或阴性）标本共 37 份，分别采用实施例 3 所述的检测 CIC 的方法和强酸解离法、胃蛋白酶消化法对 37 份血清标本进行解离，然后采用化学发光法 i2000 免疫分析仪检测 HBsAg，结果见表 4。

[0195] 表 4 实施例 3 对游离 HBsAg 阴性的乙肝患者 CIC 中 HBsAg 检测结果 (n=37)

[0196]

方法	阳性数	阳性率(%)	定量结果( $\bar{x} \pm s$ , IU/ml)
实施例 3	21	56.8	37.6±39.2
强酸解离法	11	29.7	12.5±13.9
胃蛋白酶消化法	7	18.9	5.8±5.3

[0197] 3. 采用实施例 3 所述的免疫复合物缓冲解离剂与抗 C1q 抗体包被微孔的抗 Ig 免疫捕获法（C1q 免疫捕获法）、抗 Igs 抗体包被微孔的抗 Ig 免疫捕获法（抗 Ig 免疫捕获法）检测 HBsAg- 抗 -HBs 免疫复合物的结果比较

[0198] 随机收集日常工作中 ELISA 检测慢性乙肝病人（血清 HBsAg、抗 -HBe 和抗 -HBc 阳性）标本共 52 份，分别采用实施例 3 所述的检测 CIC 的方法和 C1q 免疫捕获法、抗 Ig 免疫捕获法对 52 份血清标本进行解离，然后采用 ELISA 法检测 HBsAg，结果见表 5。

[0199] 表 5 实施例 3 对慢性乙肝患者 CIC 中的 HBsAg 检测结果 (n=52)

[0200]



方法	阳性数	阳性率(%)	OD 值( $\bar{x} \pm s$ , A)
实施例 3	49	94.2	0.876 $\pm$ 0.532
C1q 免疫捕获法	28	53.8	0.421 $\pm$ 0.417
抗 Ig 免疫捕获法	37	71.2	0.598 $\pm$ 0.481

[0201] 4. 采用实施例 8 所述的免疫复合物缓冲解离剂与胃蛋白酶消化法、强酸解离法、表面活性剂活检测自身免疫性疾病 CIC 中的抗体结果比较

[0202] 随机收集日常工作中自身免疫性疾病患者（活动期与静止期系统性红斑狼疮 SLE, 干燥综合症 SS, 类风湿关节炎 RA 等）标本各 1 份, 分别采用实施例 8 所述的免疫复合物缓冲解离剂、胃蛋白酶消化法、强酸解离法和表面活性剂解离法对其血清标本进行解离, 然后采用欧蒙免疫印迹试验 (WB) 检测自身抗体谱, 结果见表 6。

[0203] 表 6 实施例 8 对自身免疫性疾病患者 CIC 中的自身抗体检测结果

[0204]

病例编号	血清中游离 抗体检测结果	解离方法	CIC 解离后 抗体检测结果	结论 (是否存在对应 CIC)
病例 1 (活动期-系 统性红斑狼	抗 ANA++, 抗 dsDNA+, 抗 sm+, 抗组蛋白+	实施例 8	抗 dsDNA++	存在 dsDNA CIC
		强酸解离法	-	不存在
		胃蛋白酶消化法	-	不存在

[0205]

疮 SLE)		表面活性剂解离法	抗 dsDNA±	无法判断*
病例 2 (静止期-系 统性红斑狼 疮 SLE)	抗 ANA+, 抗 sm+  抗 SSA+	实施例 8	抗 dsDNA+	存在 dsDNA CIC
		强酸解离法	-	不存在
		胃蛋白酶消化法	-	不存在
		表面活性剂解离法	-	不存在
病例 3 (干燥综合 症 SS)	抗 ANA+, 抗 SSA+, 抗 Ro52+	实施例 8	抗 SSA+, 抗 SSB+	存在两种 CIC
		强酸解离法	-	不存在
		胃蛋白酶消化法	-	不存在
		面活性剂解离法	-	不存在
病例 4 (类风湿关 节炎 RA)	抗 ANA+, RF+,  抗 SSA+, 抗 Ro52+	实施例 8	抗 SSA+, 抗 Ro52+	存在两种 CIC
		强酸解离法	-	不存在
		胃蛋白酶消化法	-	不存在
		面活性剂解离法	-	不存在

[0206] 注：±、+、++、+++ 代表阳性程度递增，- 代表阴性结果。\* 因未将 CIC 分离后进行抗 -dsDNA 检测，故检测到的抗 -dsDNA 阳性无法判断该抗体是否来自 CIC 中的抗体还是游离抗体。

[0207] 5. 采用实施例 3 和实施例 8 所述的免疫复合物缓冲解离剂检测不同体液中 CIC 中的抗原或抗体结果

[0208] 收集日常工作中慢性乙肝患者的尿液各 13 份，长期使用胰岛素治疗的 II 型糖尿病患者血清 15 份，睾酮水平低下致不孕不育患者的血清 11 份，类风湿关节炎患者关节腔液 7 份，采用实施例 3 和实施例 8 对上述体液标本 CIC 中的抗原或抗体进行解离，然后采用 ELISA、化学发光法、免疫印迹试验检测相应的抗原或抗体，其中尿液进行 10 倍沉淀浓缩，结果见表 7。

[0209] 表 7 实施例 3 和实施例 8 对不同体液中 CIC 中的抗原或抗体检测结果

[0210]

病种	标本类型	例数	检测项目	实施方法	阳性率 (%)
乙肝患者	尿液	13	HBsAg	实施例 3	38.5
II 型糖尿病	血清	15	胰岛素抗体	实施例 8	46.7
不孕不育	血清	11	睾酮	实施例 3	27.3

[0211]

类风湿关节炎	关节腔液	7	抗 -CCP、抗 -RA33	实施例 8	100
--------	------	---	----------------	-------	-----

[0212] 总之，以上所述仅为本发明的较佳实施例，凡依本发明申请专利范围所作的均等变化与修饰，皆应属本发明专利的涵盖范围。

专利名称(译)	一种用于免疫复合物缓冲解离剂的CIC分离剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN103777007A</a>	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201410033537.8	申请日	2014-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第一一七医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第一一七医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第一一七医院		
[标]发明人	成军 王国政 戴玉柱 孙长贵 陈达伟 江晓肖 马炬明 张益明		
发明人	成军 王国政 戴玉柱 孙长贵 陈达伟 江晓肖 马炬明 张益明		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/54393 G01N2800/50 G01N2800/52		
代理人(译)	陈丽霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及医学检测领域，公开了一种用于免疫复合物缓冲解离剂的CIC分离剂，每1L的CIC分离剂包括以下组分：5.2g-7.7g的硼砂、4.1g-6.1g的硼酸、70g-90g的聚乙二醇、6.2g-9.2g的氯化钠、100μl-500μl的液体生物防腐剂、余量为蒸馏水。本发明利用该种免疫复合物缓冲解离剂检测CIC的方法，不仅建立了特异性检测CIC中抗原的标准操作流程，还建立了特异性检测CIC中抗体的标准操作流程，这是现有CIC检测方法都无法解决的问题。该种免疫复合物缓冲解离剂应用于患有感染性疾病、内分泌代谢性疾病、自身免疫性疾病、部分肿瘤疾病患者体液标本中CIC的检测。

空白值 (IU/ml)	测定值 (IU/ml)	结果
<Cutoff	>Cutoff	样本中存在 CIC，具体含量以测定值大小判断
<Cutoff	<Cutoff	样本中不存在 CIC
>Cutoff	>Cutoff	若测定值>130%空白值，则样本中存在 CIC，具体含量以(测定值-空白值)差值大小判断，反之则判为不存在 CIC
>Cutoff	<Cutoff	此类型结果模式不存在，或操作误差