



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108279302 A

(43)申请公布日 2018.07.13

(21)申请号 201710561754.8

(22)申请日 2017.07.11

(71)申请人 深圳市伯劳特生物制品有限公司
地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾
大道2076号中国高科大厦六楼A2

(72)发明人 王洪涛 张永顶 马伟民

(74)专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事
务所(普通合伙) 44285
代理人 王仲凯

(51) Int. Cl.
G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽
门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及酶联免疫技术领域,公开了一种
用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆
菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法。本发明所述
组合物包括封闭液和酶标稳定稀释液;所述封闭
液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠
和柠檬酸,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、
BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。本发明
从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,
通过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较
长时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物
制备的幽门螺旋杆菌检测试剂盒在具有较佳稳
定性的基础上,还能够对不同亚型的幽门螺旋杆
菌分型,具备较高的敏感性和特异性。

1. 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,其特征在于,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。

2. 根据权利要求1所述组合物,其特征在于,所述封闭液含有0.6%–1%BSA,0.8%–1.5%的甜菜碱、0.8%–1.5%甘露醇、0.02%叠氮钠、0.01M磷酸氢二钠和1.5%–2.5%柠檬酸,pH值为7.4,余量为水。

3. 根据权利要求1所述组合物,其特征在于,所述酶标稀释液含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2%–3%的BSA、1.8%–2.4%的阿拉伯树胶、0.8%–1.5%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300,余量为水。

4. 权利要求1–3任意一项所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用。

5. 根据权利要求4所述应用,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒为幽门螺杆菌酶联免疫检测试剂盒。

6. 一种幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:

包被有幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原的蛋白芯片、用酶标稀释液稀释的酶标抗体、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原后采用封闭液封闭,所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。

7. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述封闭液含有0.6%–1%BSA,0.8%–1.5%的甜菜碱、0.8%–1.5%甘露醇、0.02%叠氮钠、0.01M磷酸氢二钠和1.5%–2.5%柠檬酸,pH值为7.4,余量为水。

8. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述酶标稀释液含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2%–3%的BSA、1.8%–2.4%的阿拉伯树胶、0.8%–1.5%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300,余量为水。

9. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原选自CagA、VacA、UreA、UreB、HSP60、gGT、FliD、HtrA、HpaA、CtkA、NapA、HP231、JHP940、Omp、HcpC、Catalase、TonB中的一种或两种以上。

10. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原采用含有PEG、Proclin300以及2-羟基- β -环糊精的缓冲液为抗原包被缓冲液进行包被。

11. 根据权利要求2–10任意一项所述试剂盒,其特征在于,所述蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上。

12. 权利要求6所述试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

将幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原的蛋白芯片,所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸;

配制含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300的酶标稀释液并稀释酶标抗体,获得用酶标稀释液稀释的酶标抗体,然后配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒。

一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆菌抗体谱 检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫技术领域,具体涉及一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,*H.pylori*)是一种定植于胃黏膜的病原菌,世界范围内约有高达50-70%的感染率。该菌可以引发多种消化道疾病,而且可能与某些消化道以外的疾病有着某种联系,如贫血、消化不良和一些自身免疫疾病。

[0003] *H.pylori*致病力和致癌性取决于其毒力因子,目前已知的毒力因子主要有细胞毒素相关蛋白A(Cytotoxin associated protein A,CagA)、空泡毒素A(Vacuolating toxinA,VacA)、尿素酶A(UreaseA,UreA)、尿素酶B(UreaseB,UreB)、热休克蛋白60(Heat Shock Protein 60,HSP60)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase,gGT)、鞭毛钩相关蛋白(Flagellar hook-associated protein 2,FlhD)、高温热激需求蛋白(High temperature requirement A,HtrA)、幽门螺杆菌鞭毛粘附素(*helicobacter pylori* adhesin, HpaA)、细胞转运蛋白激酶(Cell translocating kinase,CtkA)、中性白细胞激活蛋白(Neutrophil-activating protein,NapA)、假设蛋白(HP231),胃癌相关因子(JHP940),外膜蛋白(Omp),富含半胱氨酸蛋白C(HcpC),过氧化氢酶(Catalase),依赖铁的载体转运蛋白(TonB Protein)。

[0004] 但并非所有*H.pylori*都存在上述毒力因子,而不同*H.pylori*菌株所具有的不同的毒力因子及数量也决定了菌株本身的毒力和致病力及致癌风险,已有的研究结论表明CagA、VacA和GroEL(HSP60)为识别患者感染高风险*H.pylori*菌株的潜在标志物,与胃癌的发生有关,能够作为一项*H.pylori*胃癌发生风险分层指标。携带有不同毒力因子的*H.pylori*菌株感染导致机体产生针对不同的毒力因子的相应抗体,因此分析感染者血清中的抗体构成及滴度,有助于反映感染者所感染的*H.pylori*菌株所具有的毒力因子种类和数量,从而预测*H.pylori*的毒力和致病力以及临床后果,选择适宜的治疗方案,体现精准医疗的精神,降低治疗风险及费用。

[0005] 针对幽门螺杆菌的诊断已经有许多的临床检测方法,包括侵入性和非侵入性。但无论是哪一种方法,都只能诊断幽门螺杆菌感染的存在与否,对于*H.pylori*的分类、毒力判断、临床后果预测以及治疗方案的制定都无法提供进一步的帮助,而临床迫切需要一种方便、快捷、准确、敏感的检测方法不仅可以确定*H.pylori*感染,还可以判断*H.pylori*感染的类型、毒力强弱以及致病、致癌风险,从而更有效和精准地指导治疗和进行预后判断。

[0006] ELISA(酶联免疫吸附试验),指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法,是酶免疫测定技术中应用最广的技术。中国专利CN102721815A提供了一种幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗体检测试剂盒,其基于ELISA原理,以6种幽门螺旋杆菌毒力蛋白作为抗原对患者血清进行检测,以此

判断菌株毒力强弱和实现半定量检测。但是,该试剂盒的稳定性并不好,这也是所有类型酶联免疫试剂盒所面临的共同问题,此外,该试剂盒仍然无法区分各亚型的幽门螺旋杆菌,检测特异性和敏感性也不尽如人意。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,使得所述组合物用于制备酶联免疫试剂盒时能够显著提高试剂盒在低温和室温下的稳定性,保存时间延长;

[0008] 本发明的另外一个目的在于提供上述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是用于检测幽门螺旋杆菌的相关试剂盒;

[0009] 本发明的另外一个目的在于提供一种包含上述组合物的幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法,使得所述试剂盒在低温和室温下具有较长时间的稳定性,同时检测结果具有较高的特异性和敏感性。

[0010] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0011] 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。

[0012] 针对现有酶联免疫试剂盒稳定较差、保存时间较短的缺陷,本发明意外发现了从制备试剂盒的封闭液和酶标稀释液(用于稀释酶标抗原或抗体用)入手,通过选择合适的组分完善两者的组成,能够显著提高酶联免疫试剂盒的稳定性和保存时间。

[0013] 作为优选,所述封闭液含有0.6%–1%BSA,0.8%–1.5%的甜菜碱、0.8%–1.5%甘露醇、0.02%叠氮钠、0.01M磷酸氢二钠和1.5%–2.5%柠檬酸,pH值为7.4,余量为水,所述百分比为质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述封闭液含有0.9%BSA,1%的甜菜碱、1%甘露醇、0.02%叠氮钠、0.01M磷酸氢二钠和2%柠檬酸,pH值为7.4,余量为超纯水。

[0014] 作为优选,所述酶标稀释液含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2%–3%的BSA、1.8%–2.4%的阿拉伯树胶、0.8%–1.5%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300,余量为水,所属百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述酶标稀释液含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2.5%的BSA、2%的阿拉伯树胶、1%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300。

[0015] 本发明利用上述组合物进行幽门螺旋杆菌酶联免疫试剂盒的制备,与采用常规的封闭液和酶标稀释液幽门螺旋杆菌酶联免疫试剂盒相比,在低温(2–8℃)下,本发明试剂盒在放置24个月后仍然能够保持制备完成时的稳定性,而对照的试剂盒在放置18个月后就出现很大程度的不稳定性;在室温(18–28℃)下,本发明试剂盒在放置12个月后就仍然能够保持制备完成时的稳定性,而对照的试剂盒在放置6个月后就出现很大程度的不稳定性。

[0016] 基于上述优异的技术效果,本发明提出了所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是在制备幽门螺旋杆菌酶联免疫检测试剂盒中的应用。

[0017] 同时,本发明还提供一种幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒,包括以下组分:

[0018] 包被有幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原的蛋白芯片、用酶标稀释液稀释的酶标抗体、样品稀释液、洗涤液和显色液；其中，所述蛋白芯片包被幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原后采用封闭液封闭，所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸，所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300，所述封闭液和酶标稀释液与前述组合物方案相同。

[0019] 作为优选，所述幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原选自CagA、VacA、UreA、UreB、HSP60、gGT、Flid、HtrA、HpaA、CtkA、NapA、HP231、JHP940、Omp、HcpC、Catalase、TonB中的一种或两种以上；在本发明具体实施方式中，所述幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原为CagA、VacA、UreA、UreB、HSP60、gGT、Flid、HtrA、HpaA、CtkA、NapA、HP231、JHP940、Omp、HcpC、Catalase和TonB。

[0020] 在包被中，为了使得包被更稳定、抗原包被点更规则、更圆，CV更小，所述幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原采用含有PEG（例如PEG4000）、Proclin300以及2-羟基-β-环糊精的缓冲液为抗原包被缓冲液进行包被；作为优选，所述缓冲液选自PH9.6的CB缓冲液、PH8.5的Tris缓冲液和PH7.4-7.6的PBS缓冲液；在本发明具体实施方式中，所述抗原包被缓冲液可具体选自PH9.6的CB缓冲液（含有5%的PEG、0.05%的Proclin300，以及0.02%的2-羟基-β-环糊精）、PH8.5的Tris缓冲液（含5%的PEG、0.05%的Proclin300，以及0.02%的2-羟基-β-环糊精）和PH7.4-7.6的PBS缓冲液（含6%的PEG、0.05%的Proclin300，以及0.02%的2-羟基-β-环糊精）；更为具体地，在包被过程中：

[0021] CagA、VacA、HtrA、CtkA、NapA、Omp、Catalase采用PH9.6的CB缓冲液（含有5%的PEG、0.05%的Proclin300，以及0.02%的2-羟基-β-环糊精）稀释至工作浓度进行包被；

[0022] UreA、UreB、HSP60、Flid、gGT采用PH8.5的Tris缓冲液（含5%的PEG、0.05%的Proclin300，以及0.02%的2-羟基-β-环糊精）稀释至工作浓度进行包被；

[0023] HpaA、HP231、HcpC、JHP940、TonB采用PH7.4-7.6的PBS缓冲液（含6%的PEG、0.05%的Proclin300，以及0.02%的2-羟基-β-环糊精）稀释至工作浓度进行包被；

[0024] 此外，本发明试剂盒中的蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上；更为具体地，至少有一个阴性质控点（NC）和一个阳性质控点（PC）；至少一个样品点质控点（SC）和一个酶标质控点（EC）；至少3个参考曲线点（S1-S3）以及一个芯片本身包被的位置参考点（Loc）。

[0025] 在具体实施方式中，本发明蛋白芯片上还包含一个阴性质控点（NC）和一个阳性质控点（PC）；一个样品点质控点（SC）和一个酶标质控点（EC）；3个参考曲线点（S1-S3）以及一个芯片本身包被的位置参考点（Loc）。

[0026] 其中，阳性质控点可以是人IgG，则对应使用的酶标抗体就是抗人IgG的酶标。阳性质控点也可以是包被BSA偶联的BNP，则对应使用的酶标抗体就是抗人IgG的酶标以及抗BNP的酶标的混合液。

[0027] 而阴性质控点可以是低于反应信号值的微量浓度的人IgG，或采用其他的无关蛋白来替代；样品质控点可以是羊抗人的IgG或其他的抗人IgG；酶标质控点可以是人IgG，或其他的抗兔的抗体，例如羊抗兔IgG抗体。所述参考曲线点在具体实施过程中是低、中、高三种浓度的人IgG。

[0028] 蛋白芯片本身的位置参考点是含有0.2%的2,9-二甲基噻吡啶酮的DMSO溶液，或

是含有任何除蓝色之外其他颜色的油溶性染料,与有机溶剂配伍,按一定比例配比,形成有机着色剂,主要对蛋白芯片上阵列的起定位作用。

[0029] 本发明所述酶标抗体中酶标记物可选择常规的酶以及对应的显色液,如辣根过氧化物酶和TMB显色剂。

[0030] 本发明还对对应提供了所述试剂盒的制备方法,包括:

[0031] 将幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原的蛋白芯片,所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸;

[0032] 配制含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300的酶标稀释液并稀释酶标抗体,获得用酶标稀释液稀释的酶标抗体,然后配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒。

[0033] 采用本发明幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒能够提高HP检测的敏感性(99.5%)和特异性(100%),与免疫组化结果高度一致。

[0034] 由以上技术方案可知,本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制备的幽门螺旋杆菌检测试剂盒在具有较佳稳定性的基础上,还能够对不同亚型的幽门螺旋杆菌分型,具备较高的敏感性和特异性。

具体实施方式

[0035] 本发明公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述组合物、试剂盒和应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的组合物、试剂盒和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0036] 以下就本发明所提供的一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法做进一步说明。

[0037] 实施例1:本发明所述幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒的制备

[0038] 1、幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原和相关蛋白的包被

[0039] 蛋白芯片阵列中的PC、NC、S1、S2、S3、EC分别包被的是2ug/ml、0.01ug/ml、0.5ug/ml、2ug/ml、4ug/ml的人IgG,可用PH9.6的CB缓冲液(含5%的PEG、0.05%的Proclin300,以及0.02%的2-羟基- β -环糊精)进行稀释。

[0040] SC点使用的是2ug/ml的羊抗人IgG抗体,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液(含5%的PEG、0.05%的Proclin300,以及0.02%的2-羟基- β -环糊精)。

[0041] Loc点使用的是含有0.2%的2,9-二甲基喹吡啶酮的DMSO溶液。

[0042] CagA、VacA、HtrA、CtkA、NapA、Omp、Catalase的稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液(含5%的PEG、0.05%的Proclin300,以及0.02%的2-羟基- β -环糊精),终浓度分别为6ug/ml、8ug/ml、15ug/ml、10ug/ml、20ug/ml、12ug/ml、30ug/ml。

[0043] UreA、UreB、HSP60、Flid、gGT的稀释液为PH8.5的Tris缓冲液(含5%的PEG、

0.05%的Proclin300,以及0.02%的2-羟基-β-环糊精),终浓度分别为10ug/ml、10ug/ml、15ug/ml、12ug/ml、80ug/ml。

[0044] HpaA、HP231、HcpC、JHP940、TonB的稀释缓冲液为PH7.4-7.6的PBS 缓冲液(含6%的PEG、0.05%的Proclin300,以及0.02%的2-羟基-β-环糊精),终浓度分别为15ug/ml、30ug/ml、15ug/ml、60ug/ml、40ug/ml。

[0045] 将稀释好的蛋白分别用0.22um的滤膜过滤,然后用BioDot精密点样仪进行阵列的包被。全部阵列完成点样之后,将芯片置于2-8℃,过夜包被 24-30h。蛋白芯片阵列可参照如下表呈现的阵列,也可根据实际需要调整,不做限制:

[0046] 表1蛋白芯片阵列

[0047]

PC	CagA	gGT	NapA	Catalase
NC	VacA	Flid	HP231	TonB
S1	UreA	HtrA	JHP940	SC
S2	UreB	HpaA	Omp	EC
S3	HSP60	CtkA	HcpC	Loc

[0048] 2、封闭

[0049] 取出包被的芯片,用PH7.4的PBST洗涤液清洗3次,然后每孔加入150uL 的封闭液(0.9%BSA,1%的甜菜碱、1%甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和2%柠檬酸,pH值为7.4),室温封闭1h,然后拍干,于湿度15%以下,室温放置,干燥4h,后密封、2-8℃保存,获得包被有幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原的蛋白芯片。

[0050] 3、配制酶标稀释液、酶标抗体、显色液、样品稀释液和浓缩洗涤液

[0051] 酶标稀释液:含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2.5%的BSA、2%的阿拉伯树胶、1%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300;

[0052] 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体;

[0053] 使用时,用酶标稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体稀释至 4K倍(酶标抗体浓度)。

[0054] 显色液:沉降型TMB。

[0055] 样品稀释液:0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05% Tween20,0.01%酪蛋白, pH7.4。

[0056] 10倍浓缩洗涤液:0.2M Tris,1.5M NaCl,0.5% Tween20,pH7.4。

[0057] 上述包被有幽门螺旋杆菌毒力蛋白抗原的蛋白芯片、酶标稀释液稀释的酶标抗体和显色液、以及样品稀释液和10倍浓缩洗涤液组成本发明幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒。

[0058] 4、检测方法

[0059] (1)取出蛋白芯片,平衡至室温;

[0060] (2)加样:将阴性和阳性对照血清、以及用样品稀释液稀释了101倍的待测样品,每孔100uL加入待测芯片孔中反应。

[0061] (3)温育:室温静置反应30min。加300uL洗涤液(用超纯水稀释10 倍后使用),洗涤3次,每次静置1min。

[0062] (4)加酶标抗体:每孔加入50uL酶标抗体。

[0063] (5) 温育: 室温静置反应30min。加300uL洗涤液, 洗涤3次, 每次静置1min。

[0064] (6) 显色: 每孔加入TMB显色剂50uL, 室温静置, 避光反应30min。

[0065] (7) 测定: 30min内, 用检测仪读取并计算每个反应孔对应抗体的信号值; 其中, 信号检测体系也可以是化学发光的方式来实现, 可用化学发光底物, 如鲁米诺等, 然后通过荧光检测装置来进行结果的读取。

[0066] 实施例2: 敏感性和特异性检测

[0067] 选取263例临床血清样本, 其中阴性样本68例, 阳性样本195例, 所有样本均通过免疫组化实验诊断为幽门螺杆菌感染阳性、阴性患者的血清, 具体的实验结果和数据如下表:

[0068] 表2

检测结果		n	一致的例数	一致率分母	一致率(%)
免疫组化	蛋白芯片试剂				
+	+	194	194	195	99.49%
+	-	1			
-	+	0	68	68	100%
-	-	68			
合计		263	262	263	99.62%

[0070] 由表2可知, 本发明的芯片试剂盒对HP感染检测的敏感度(阳性正确率) 可达到99.49%, 特异性(阴性正确率) 100%, 与免疫组化的检测结果高度一致。

[0071] 实施例3: 本发明所述试剂盒稳定性检测

[0072] 对照试剂盒: 按照实施例1的方法进行制备, 区别在于封闭液和酶标稀释液均采用常规的0.01M PBS (PH7.4) +10%BSA;

[0073] 试验试剂盒: 实施例1试剂盒;

[0074] 检测方法: 将两种试剂盒分别置于室温(18-28℃) 和低温(2-8℃) 下放置一段时间, 然后采用相同血清按照实施例1检测方法检测, 统计仪器信号值, 结果见表3-6。

[0075] 1、实施例1试剂盒低温下的稳定性数据

[0076] 表3

[0077]

对应抗原	0 个月	6 个月	6 个月/0 个月	12 个月	12 个月/0 个月
CagA	36009	35110	97.50%	34368	95.44%
VacA	30336	29317	96.64%	30311	99.92%
UreA	45682	45621	99.87%	45011	98.53%
UreB	9005	8560	95.06%	8875	98.56%
HSP60	13315	13251	99.52%	13301	99.89%
gGT	10958	10652	97.21%	9985	91.12%
FliD	6864	6580	95.86%	6644	96.79%
HtrA	7878	7811	99.15%	7789	98.87%
HpaA	26104	25443	97.47%	25004	95.79%
CtkA	16582	15988	96.42%	16528	99.67%
NapA	26796	26621	99.35%	24861	92.78%
HP231	5689	5645	99.23%	5874	103.25%
JHP940	6715	6625	98.66%	6775	100.89%
Omp	9011	8574	95.15%	8068	89.54%
HcpC	12583	12524	99.53%	12754	101.36%
Catalase	25725	25361	98.59%	24968	97.06%
TonB Protein	34017	33650	98.92%	33562	98.66%
对应抗原	12 个月/6 个月	18 个月	18 个月/0 个月	18 个月/6 个月	18 个月/12 个月
CagA	97.89%	34051	94.56%	96.98%	99.08%
VacA	103.39%	28841	95.07%	98.38%	95.15%
UreA	98.66%	46212	101.16%	101.30%	102.67%
UreB	103.68%	8326	92.46%	97.27%	93.81%

[0078]

HSP60	100.38%	12561	94.34%	94.79%	94.44%
gGT	93.74%	9882	90.18%	92.77%	98.97%
FliD	100.97%	6630	96.59%	100.76%	99.79%
HtrA	99.72%	7120	90.38%	91.15%	91.41%
HpaA	98.27%	24117	92.39%	94.79%	96.45%
CtkA	103.38%	14867	89.66%	92.99%	89.95%
NapA	93.39%	26621	99.35%	100.00%	107.08%
HP231	104.06%	5065	89.03%	89.73%	86.23%
JHP940	102.26%	6025	89.72%	90.94%	88.93%
Omp	94.10%	8814	97.81%	102.80%	109.25%
HcpC	101.84%	12511	99.43%	99.90%	98.09%
Catalase	98.45%	24056	93.51%	94.85%	96.35%
TonB Protein	99.74%	33895	99.64%	100.73%	100.99%
对应抗原	24 个月	24 个月/0 个月	24 个月/6 个月	24 个月/12 个月	24 个月/18 个月
CagA	33795	93.85%	96.25%	98.33%	99.25%
VacA	26885	88.62%	91.70%	88.70%	93.22%
UreA	45842	100.35%	100.48%	101.85%	99.20%
UreB	7998	88.82%	93.43%	90.12%	96.06%
HSP60	11885	89.26%	89.69%	89.35%	94.62%
gGT	10107	92.23%	94.88%	101.22%	102.28%
FliD	6052	88.17%	91.98%	91.09%	91.28%
HtrA	7069	89.73%	90.50%	90.76%	99.28%
HpaA	23792	91.14%	93.51%	95.15%	98.65%
CtkA	15051	90.77%	94.14%	91.06%	101.24%
NapA	25589	95.50%	96.12%	102.93%	96.12%
HP231	5515	96.94%	97.70%	93.89%	108.88%
JHP940	5986	89.14%	90.35%	88.35%	99.35%
Omp	8698	96.53%	101.45%	107.81%	98.68%
HcpC	12405	98.59%	99.05%	97.26%	99.15%
Catalase	23968	93.17%	94.51%	95.99%	99.63%
TonB Protein	33086	97.26%	98.32%	98.58%	97.61%

[0079] 由表3可以看出,本发明试剂盒分别检测了在低温下放置0、6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了24个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、6、12、18个月的检测信号值相比,几乎均处于90%以上,证明本发明所述试剂盒在低温条件下放置24个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0080] 2、实施例1试剂盒室温下的稳定性数据

[0081] 表4

[0082]

对应抗原	0 个月	3 个月	3 个月/0 个月	6 个月	6 个月/0 个月
CagA	36009	35425	98.38%	34665	96.27%
VacA	30336	29584	97.52%	30102	99.23%
UreA	45682	45114	98.76%	44952	98.40%
UreB	9005	8652	96.08%	8768	97.37%
HSP60	13315	13368	100.40%	13007	97.69%
gGT	10958	10421	95.10%	10214	92.98%
FliD	6864	6520	94.99%	6598	96.12%
HtrA	7878	7725	98.06%	7675	97.42%
HpaA	26104	24887	95.34%	24921	95.47%
CtkA	16582	16102	97.11%	16024	96.63%
NapA	26796	24021	89.64%	24012	89.61%
HP231	5689	5769	101.41%	5685	99.93%
JHP940	6715	6684	99.54%	6486	96.59%
Omp	9011	7875	87.39%	7928	87.98%
HcpC	12583	12623	100.32%	12147	96.54%
Catalase	25725	25212	98.01%	24991	97.15%
TonB Protein	34017	33685	99.02%	33558	98.65%
对应抗原	6 个月/3 个月	9 个月	9 个月/0 个月	9 个月/3 个月	9 个月/6 个月
CagA	97.85%	34037	94.52%	96.08%	98.19%
VacA	101.75%	29885	98.51%	101.02%	99.28%
UreA	99.64%	44260	96.89%	98.11%	98.46%
UreB	101.34%	8667	96.25%	100.17%	98.85%
HSP60	97.30%	12889	96.80%	96.42%	99.09%
gGT	98.01%	10112	92.05%	97.03%	99.00%
FliD	101.20%	6069	88.42%	93.08%	91.98%
HtrA	99.35%	7712	97.89%	99.83%	100.48%
HpaA	100.14%	25004	95.79%	100.47%	100.33%
CtkA	99.52%	15829	95.46%	98.30%	98.78%
NapA	99.96%	23682	88.38%	98.59%	98.63%
HP231	98.54%	5591	98.28%	96.91%	98.35%
JHP940	97.04%	6405	95.38%	95.83%	98.75%
Omp	100.67%	8018	88.98%	101.82%	101.14%
HcpC	96.23%	11996	95.33%	95.03%	98.76%
Catalase	99.12%	25107	97.60%	99.58%	100.46%
TonB Protein	99.62%	32984	96.96%	97.92%	98.29%
对应抗原	12 个月	12 个月/0 个月	12 个月/3 个月	12 个月/6 个月	12 个月/9 个月
CagA	32965	91.55%	93.06%	95.10%	96.85%

[0083]

VacA	29689	97.87%	100.35%	98.63%	99.34%
UreA	44052	96.43%	97.65%	98.00%	99.53%
UreB	8582	95.30%	99.19%	97.88%	99.02%
HSP60	12791	96.06%	95.68%	98.34%	99.24%
gGT	9965	90.94%	95.62%	97.56%	98.55%
FliD	5897	85.91%	90.44%	89.38%	97.17%
HtrA	7659	97.22%	99.15%	99.79%	99.31%
HpaA	24961	95.62%	100.30%	100.16%	99.83%
CtkA	14928	90.03%	92.71%	93.16%	94.31%
NapA	23419	87.40%	97.49%	97.53%	98.89%
HP231	5372	94.43%	93.12%	94.49%	96.08%
JHP940	6380	95.01%	95.45%	98.37%	99.61%
Omp	7798	86.54%	99.02%	98.36%	97.26%
HcpC	12004	95.40%	95.10%	98.82%	100.07%
Catalase	24285	94.40%	96.32%	97.17%	96.73%
TonB Protein	32127	94.44%	95.37%	95.74%	97.40%

[0084] 由表4可以看出,本发明试剂盒分别检测了在常温下放置0、3、6、9、12个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了12个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、3、6、9个月的检测信号值相比,几乎均处于90%以上,证明本发明所述试剂盒在常温条件下放置12个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0085] 3、实施例1试剂盒和对照试剂盒低温下的稳定性数据对比

[0086] 表5

[0087]

	抗原	实施例1	对照	对照/实施例1		抗原	实施例1	对照	对照/实施例1
6个月	CagA	35110	35010	99.72%	12个月	CagA	34368	33917	98.69%
	VacA	29317	29205	99.62%		VacA	30311	29785	98.26%
	UreA	45621	43986	96.42%		UreA	45011	44316	98.46%
	UreB	8560	8598	100.44%		UreB	8875	8078	91.02%
	HSP60	13251	12415	93.69%		HSP60	13301	11542	86.78%
	gGT	10652	11630	109.18%		gGT	9985	10210	102.25%
	FliD	6580	6643	100.96%		FliD	6644	6254	94.13%
	HtrA	7811	7635	97.75%		HtrA	7789	7594	97.50%
	HpaA	25443	24056	94.55%		HpaA	25004	24501	97.99%
	CtkA	15988	16840	105.33%		CtkA	16528	15040	91.00%
	NapA	26621	24142	90.69%		NapA	24861	23298	93.71%
	HP231	5645	5530	97.96%		HP231	5874	5425	92.36%
	JHP940	6625	6350	95.85%		JHP940	6775	6520	96.24%
	Omp	8574	8865	103.39%		Omp	8068	8105	100.46%

[0088]

	HcpC	12524	13222	105.57%		HcpC	12754	12587	98.69%
	Catalase	25361	26352	103.91%		Catalase	24968	25122	100.62%
	TonB Protein	33650	34082	101.28%		TonB Protein	33562	33674	100.33%
18 个月	CagA	34051	28947	85.01%	24 个月	CagA	33795	2066	6.11%
	VacA	28841	20364	70.61%		VacA	26885	2036	7.57%
	UreA	46212	20156	43.62%		UreA	45842	2154	4.70%
	UreB	8326	2650	31.83%		UreB	7998	958	11.98%
	HSP60	12561	5561	44.27%		HSP60	11885	1042	8.77%
	gGT	9882	4754	48.11%		gGT	10107	1520	15.04%
	FliD	6630	2140	32.28%		FliD	6052	778	12.86%
	HtrA	7120	2354	33.06%		HtrA	7069	1103	15.60%
	HpaA	24117	10326	42.82%		HpaA	23792	748	3.14%
	CtkA	14867	6873	46.23%		CtkA	15051	875	5.81%
	NapA	26621	2312	8.68%		NapA	25589	238	0.93%
	HP231	5065	1524	30.09%		HP231	5515	153	2.77%
	JHP940	6025	2520	41.83%		JHP940	5986	528	8.82%
	Omp	8814	2318	26.30%		Omp	8698	215	2.47%
	HcpC	12511	5267	42.10%		HcpC	12405	261	2.10%
Catalase	24056	7788	32.37%	Catalase	23968	1174	4.90%		
TonB Protein	33895	4783	14.11%	TonB Protein	33086	1570	4.75%		

[0089] 由表5可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在低温下放置6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了18个月的对照试剂盒,其检测信号值开始出现显著的下降,结合表3数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0090] 4、实施例1试剂盒和对照试剂盒常温下的稳定性数据对比

[0091] 表6

[0092]

	抗原	实施例 1	对照	对照/实施例 1		抗原	实施例 1	对照	对照/实施例 1
3 个月	CagA	35425	35006	98.82%	6 个月	CagA	34665	31017	89.48%
	VacA	29584	29660	100.26%		VacA	30102	26889	89.33%
	UreA	45114	44859	99.43%		UreA	44952	40586	90.29%
	UreB	8652	8425	97.38%		UreB	8768	7664	87.41%
	HSP60	13368	12841	96.06%		HSP60	13007	10536	81.00%
	gGT	10421	10235	98.22%		gGT	10214	8674	84.92%
	FliD	6520	6545	100.38%		FliD	6598	5427	82.25%
	HtrA	7725	7603	98.42%		HtrA	7675	6631	86.40%

[0093]

	HpaA	24887	24535	98.59%		HpaA	24921	20457	82.09%
	CtkA	16102	15574	96.72%		CtkA	16024	12238	76.37%
	NapA	24021	23562	98.09%		NapA	24012	20148	83.91%
	HP231	5769	5685	98.54%		HP231	5685	4852	85.35%
	JHP940	6684	6529	97.68%		JHP940	6486	5412	83.44%
	Omp	7875	8016	101.79%		Omp	7928	6682	84.28%
	HcpC	12623	12545	99.38%		HcpC	12147	9239	76.06%
	Catalase	25212	24688	97.92%		Catalase	24991	20124	80.52%
	TonB Protein	33685	33253	98.72%		TonB Protein	33558	28183	83.98%
9 个月	CagA	34037	3172	9.32%	12 个月	CagA	32965	171	0.52%
	VacA	29885	2892	9.68%		VacA	29689	221	0.74%
	UreA	44260	4658	10.52%		UreA	44052	508	1.15%
	UreB	8667	1205	13.90%		UreB	8582	215	2.51%
	HSP60	12889	1528	11.86%		HSP60	12791	127	0.99%
	gGT	10112	928	9.18%		gGT	9965	218	2.19%
	FliD	6069	935	15.41%		FliD	5897	133	2.26%
	HtrA	7712	804	10.43%		HtrA	7659	114	1.49%
	HpaA	25004	2206	8.82%		HpaA	24961	201	0.81%
	CtkA	15829	2038	12.88%		CtkA	14928	234	1.57%
	NapA	23682	2014	8.50%		NapA	23419	226	0.97%
	HP231	5591	682	12.20%		HP231	5372	112	2.08%
	JHP940	6405	571	8.91%		JHP940	6380	137	2.15%
	Omp	8018	686	8.56%		Omp	7798	154	1.97%
	HcpC	11996	1063	8.86%		HcpC	12004	169	1.41%
Catalase	25107	1624	6.47%	Catalase	24285	132	0.54%		
TonB Protein	32984	2117	6.42%	TonB Protein	32127	237	0.74%		

[0094] 由表6可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在常温下放置3、6、9、12个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了6个月的对照试剂盒,其检测信号值开始出现显著的下落,结合表4数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0095] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108279302A	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN2017110561754.8	申请日	2017-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
[标]发明人	王洪涛 张永顶 马伟民		
发明人	王洪涛 张永顶 马伟民		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	王仲凯		
其他公开文献	CN108279302B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及酶联免疫技术领域，公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及幽门螺旋杆菌抗体谱检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包括封闭液和酶标稳定稀释液；所述封闭液含有BSA、甜菜碱、甘露醇、叠氮钠、磷酸氢二钠和柠檬酸，所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手，通过选择适宜成分，使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时，以所述组合物制备的幽门螺旋杆菌检测试剂盒在具有较佳稳定性的基础上，还能够对不同亚型的幽门螺旋杆菌分型，具备较高的敏感性和特异性。

检测结果		n	一致的例数	一致率分母	一致率(%)
免疫组化	蛋白芯片试剂				
+	+	194	194	195	99.49%
+	-	1			
-	+	0	68	68	100%
-	-	68			
合计		263	262	263	99.62%