



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102368071 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 07

(21) 申请号 201110183669. 5

(22) 申请日 2011. 06. 30

(71) 申请人 同昕生物技术(北京)有限公司
地址 102206 北京市昌平区生命园路 29 号 A
座 204 室

(72) 发明人 彭京胜 焦守恕 李全

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

检测肺炎支原体 IgM 抗体的化学发光免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明“检测肺炎支原体 IgM 抗体的化学发光免疫试剂盒”，属于医学检测试剂。包括抗异硫氰酸荧光素的单抗包被的微孔板，异硫氰酸荧光素标记的肺炎支原体抗原、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM 和化学发光底物。该方法优势在于本底背景低、特异性高、亲和力强，同时有效降低批间差异，在免疫检测领域具有较大的应用价值。

1. 检测肺炎支原体 IgM 抗体的化学发光免疫试剂盒,包括抗异硫氰酸荧光素的单抗包被的微孔板,异硫氰酸荧光素标记的肺炎支原体抗原、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM 和化学发光底物,所述化学发光底物包括底物液 A 和底物液 B,其中 A 液为的组成为:pH 值为 7.2 ~ 8.5,浓度为 10 ~ 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02 ~ 0.1% Proclin300,0.1 ~ 1.0%吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液;B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02 ~ 0.1% Proclin300,1.0 ~ 3.0mM 的 4- 碘苯酚,0.1% ~ 1% 的 BSA,0.1 ~ 1% 的溴化十六烷基三甲基铵,10 ~ 50mM 鲁米诺溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,所述抗异硫氰酸荧光素的单抗包被微孔板的包被浓度为:2ug/ml。

3. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,所述抗异硫氰酸荧光素单抗包被的微孔板通过以下步骤制得:用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成 2ug/ml 的抗异硫氰酸荧光素单抗包被液包被微孔板。

4. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,所述异硫氰酸荧光素标记的肺炎支原体抗原通过以下步骤制得:

(1) 肺炎支原体抗原用 50mmol/L pH 9.6 碳酸缓冲液在 2 ~ 8°C 条件下透析,

(2) 异硫氰酸荧光素溶于二甲基亚砜中,终浓度为 1mg/mL,

(3) 按肺炎支原体抗原:异硫氰酸荧光素为 1mg : 150 μ g 的比例将步骤 (2) 的溶液缓慢加入肺炎支原体抗原溶液中混合均匀,避光 4°C 反应 8 小时,加入 NH₄Cl 至终浓度 50mmol/L,4°C 终止反应 2 小时,

(4) 将异硫氰酸荧光素标记抗原溶液在 0.05mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中透析,加入含 0.1% (W/W)Na₃N、1% (W/W) 牛血清白蛋白,浓度为 10mmol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中,4°C 避光保存。

5. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,所述试剂盒还包括稀释液,洗涤液,支原体抗体 IgM 阴性对照、阳性对照、校准品,辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM。

6. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,所述抗人 IgM 为羊抗人 IgM 多抗、兔抗人 IgM 多抗或鼠抗人 IgM 单抗。

检测肺炎支原体 IgM 抗体的化学发光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测试剂,特别是一种检测肺炎支原体 IgM 抗体的化学发光免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 于 1962 年自非典型肺炎患者痰液中分离首次分离出,是一类介于细菌与病毒之间、无细胞壁、能在无生命培养基上生长繁殖的原核细胞生物,属于原生生物门、柔膜体纲、支原体目、支原体科、支原体属,是引起儿童气管炎、支气管炎、原发性非典型肺炎、社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP) 的重要病原体,感染后还可引起脑炎、心肌炎、免疫性溶血性贫血、神经系统损害、肾脏损害、传染性单核细胞增多症和川崎病等并发症。

[0003] MP 通过飞沫以气溶胶微粒的形式传播,可在全球范围内引起散发呼吸道感染或小流行,每间隔 3-7 年可发生一次地区性流行。MP 感染发病率随研究对象、季节、诊断方法不同而变化。人类对 MP 普遍易感,其中 5-20 岁为高发人群。据估计,在门诊患儿中约有 20-40% 患儿感染 MP,而住院 CAP 患儿中感染率为 10-20%,CAP 患儿 MP 感染阳性率与患儿年龄增高呈正相关。MP 与其他病原的混合感染常使病程迁延,与肺炎链球菌混合感染率约为 10%,与肺炎支原体混合感染率约为 8.8%。

[0004] 肺炎支原体感染人体后,经过 2-3 周的潜伏期,表现临床症状。发病初期有咽痛、头痛、发热、乏力、肌肉酸痛、食欲减退、恶心、呕吐等症状,一般中等热度,2-3 天后出现明显的呼吸道症状,突出表现为阵发性刺激性咳嗽,以夜间为重,咳少量黏痰或黏液脓性痰,有时痰中带血,也可有呼吸困难、胸痛。除呼吸系统的表现外,支原体肺炎可伴发多系统、多器官损害。皮肤损害可表现为斑丘疹、结节性红斑、水疱疹等,胃肠道系统可见呕吐、腹泻和肝功损害,血液系统损害较常见溶血性贫血,中枢神经系统损害可见多发性神经根炎、脑膜脑炎及小脑损伤等,心血管系统病变偶有心肌炎及心包炎。因此,MP 感染早期诊断对于尽早发现和治疗 MP 感染性疾病非常重要。

[0005] 目前对 MP 的实验室诊断方法主要有病原体分离培养技术、核酸检测技术、血清学诊断技术等方法。其中病原体分离培养技术由于技术条件要求高,操作繁琐,所需时间长等限制,不能解决临床快速诊断的需要,已逐渐为其他快速检测方法所取代。PCR 法敏感性高、特异性强,尤其适用于 MP 早期快速诊断。但 PCR 因其敏感易受污染、易出现假阳性结果,且技术要求高,需要专门的仪器设备和技术人员,价格昂贵等原因限制了其在临床的普及发展。酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点,使其得到迅速的发展和广泛应用,成为最广泛应用的检测方法之一。

[0006] 化学发光免疫分析 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA) 是近年来继放射免疫分析和酶免疫分析之后发展起来的一种高灵敏度的微量测定技术,具有高灵敏度、检测范围宽、操作简便快速等优点,作为放射性免疫分析、酶免疫分析的替代者,是当前最理想

的免疫分析方法。目前没有见到基于化学发光免疫分析检测肺炎支原体的灵敏度高,稳定性好的试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明根据上述领域的存在的空白和需求,提供一种检测肺炎支原体 IgM 抗体的试剂盒,实验证明,具有本底背景低、特异性高、亲和力强,同时有效降低批间差异,在免疫检测领域具有较大的应用价值。

[0008] 检测肺炎支原体 IgM 抗体的化学发光免疫试剂盒,包括抗异硫氰酸荧光素的单抗包被的固相载体,异硫氰酸荧光素标记的肺炎支原体抗原、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM 和化学发光底物,所述化学发光底物包括底物液 A 和底物液 B,其中 A 液为的组成为:pH 值为 7.2 ~ 8.5,浓度为 10 ~ 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02 ~ 0.1% Proclin300,0.1 ~ 1.0% 吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液;B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02 ~ 0.1% Proclin300,1.0 ~ 3.0mM 的 4- 碘苯酚,0.1% ~ 1% 的 BSA,0.1 ~ 1% 的溴化十六烷基三甲基铵,10 ~ 50mM 鲁米诺溶液。

[0009] 所述抗异硫氰酸荧光素的单抗包被微孔板的包被浓度为:2ug/ml。

[0010] 所述抗异硫氰酸荧光素的单抗包被的微孔板通过以下步骤制得:用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成 2ug/ml 的抗异硫氰酸荧光素单抗包被液包被微孔板。

[0011] 所述异硫氰酸荧光素标记的肺炎支原体抗原通过以下步骤制得:

[0012] (1) 肺炎支原体抗原用 50mmol/L pH 9.6 碳酸缓冲液在 2 ~ 8℃ 条件下透析,

[0013] (2) 异硫氰酸荧光素溶于二甲基亚砷中,终浓度为 1mg/mL,

[0014] (3) 按肺炎支原体抗原:异硫氰酸荧光素为 1mg : 150 μg 的比例将步骤 (2) 的溶液缓慢加入肺炎支原体抗原溶液中混合均匀,避光 4℃ 反应 8 小时,加入 NH₄Cl 至终浓度 50mmol/L,4℃ 终止反应 2 小时,

[0015] (4) 将异硫氰酸荧光素标记抗原溶液在 0.05mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中透析,加入含 0.1% (W/W) NaN₃、1% (W/W) 牛血清白蛋白,浓度为 10mmol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中,4℃ 避光保存。

[0016] 所述试剂盒还包括稀释液,洗涤液,支原体抗体 IgM 阴性对照、阳性对照、校准品,辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM。

[0017] 所述抗人 IgM 为羊抗人 IgM 多抗、兔抗人 IgM 多抗或鼠抗人 IgM 单抗。

[0018] 本发明以异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记肺炎支原体抗原,同时以抗 FITC 单抗包被固相载体,建立间接包被肺炎支原体化学发光检测方法,该方法优势在于本底背景低、特异性高、亲和力强,同时有效降低批间差异,在免疫检测领域具有较大的应用价值。

[0019] 本发明的试剂盒采用 FITC 单抗包被微孔板,与 FITC 标记抗原和待测样本中肺炎支原体 IgM 形成固相 FITC 单抗 -FITC 标记抗原 - 抗体复合物,再与标记的抗人 IgM 形成固相 FITC 单抗 -FITC 标记抗原 - 抗体 - 标记二抗夹心复合物,然后加入化学发光底物,利用化学发光仪检测相对发光强度,定性或半定量检测待测样本中肺炎支原体 IgM 抗体,从而避免了酶免试剂存在的灵敏度低、部分底物有毒或致癌等缺点,该试剂盒具有反应速度快、光信号不受温度变化影响、成本低、易储存、特异性高、产品批间差异小、生产方便等优势,可为临床肺炎支原体相关的急性呼吸道疾病辅助诊断提供更为特异、快速、可靠的诊断依据。

[0020] 本发明的了一个主要的贡献在于提供了一种新的化学发光底物液配方,与采用现有常规底物液配方的试剂盒相比,具有灵敏度高,稳定性好等优点。

具体实施方式

[0021] 实施例 1、本发明的试剂盒制备方法

[0022] 1、本发明的试剂盒包括：

[0023] 1) 肺炎支原体 IgM 阳性对照 ;2) 肺炎支原体 IgM 阴性对照 ;3) 肺炎支原体 IgM 校准品 ;4) 包被 FITC 单抗的微孔板 ;5) FITC 标记的肺炎支原体抗原 ;6) 抗人 IgM 酶标记物 ;7) 20 倍浓缩洗涤液 ;以及 8) 化学发光底物液。

[0024] 其中,微孔板为 24、48 或 96 孔的微孔板条 ;所述抗人 IgM 为羊抗人 IgM 多抗、兔抗人 IgM 多抗或鼠抗人 IgM 单抗 ;所述酶辣根过氧化物酶。

[0025] 2、本发明 I 号试剂盒的制备方法：

[0026] 以肺炎支原体 IgM 阳性血清配制阳性对照,以健康人血清配制阴性对照,以肺炎支原体 IgM 阳性血清配制校准品,微孔板包被 FITC 单抗, FITC 标记肺炎支原体抗原,酶标记抗人 IgM,配制化学发光底物,分装上述组份,以及组装为成品。

[0027] 2.1 微孔板包被抗 FITC 单抗：

[0028] 2.1.1 包被

[0029] 用 50mM pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成包被浓度为 2ug/ml 的 FITC 单抗包被液,并将包被液负载于微孔板 (100u1/ 孔),2-8°C 包被 18-24 小时。

[0030]

名称	数量
无水碳酸钠	1.6g
碳酸氢钠	2.9g
双蒸水	定容至 1000mL
调整 pH 值至 pH9.6	

[0031] 2.1.2 封闭用含 5% BSA, pH 值为 7.0-7.5,浓度为 10mM 的 Tris 缓冲液作为封闭液封闭上述洗涤后的固相载体。

[0032]

名称	数量
Tris	1.212g
BSA	5g
Proclin 300	1mL
双蒸水	定容至 1000mL
调整 pH 值至 pH7.4	

[0033] 2.2 酶标抗人 IgM 抗体的制备采用改良的过碘酸钠法。具体步骤参见《生物化学与生物物理学报》16 卷 1984 年第 6 期,骆加里等“过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶 (HRP) 中的若干问题及高效果的标记方法”。

[0034] 2.3 FITC 标记肺炎支原体抗原的制备

[0035] 将肺炎支原体（购自广州贵翔）2mg 用 50mmol/L pH 9.6 碳酸缓冲液在 2 ~ 8℃ 条件下透析，将 FITC 溶于二甲基亚砷（DMSO）中，终浓度为 1mg/mL，按抗原：FITC = 1mg : 150 μg 的比例将 FITC 二甲基亚砷溶液缓慢加入待标记抗原溶液中混合均匀，暗处 4℃ 反应 8 小时，加入 5mol/L 的 NH₄Cl 溶液至终浓度 50mmol/L，4℃ 终止反应 2 小时，将 FITC 标记抗原溶液在 0.05mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中透析至透析液清亮，加入 0.1%（重量）NaN₃、1%（重量）牛血清白蛋白（BSA）pH 7.2 的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液中，4℃ 暗处保存。

[0036] 2.4 FITC 标记抗原、酶标记抗体稀释液的配制

[0037]

名称	数量
Tris	1.212g
BSA	5g
Proclin 300	1mL
双蒸水	定容至 1000mL
调整 pH 值至 pH7.4	

[0038]

[0039] 2.5 FITC 标记支原体抗原和酶标记抗人 IgM 工作液的配制

[0040] 将制备的 FITC 标记抗原、酶标记抗人 IgM 抗体用稀释液分别稀释成不同浓度，使用棋盘滴定法选择出最佳的稀释度标记抗原、标记抗体工作浓度为 (V/V) 1 : 3000, 1 : 6000。

[0041] 2.6 20 倍洗涤液

[0042]

Tris	24.24g
NaCl	160g
Tween-20	1mL
Proclin 300	1mL
双蒸水	定容至 1000mL
调整 pH 至 7.2-7.4	

[0043] 2.7 HRP 化学发光底物

[0044] A 液和 B 液各 1 瓶，A 液和 B 液各 1 瓶，其中 A 液为的组成为：pH 值为 8.0，浓度为 10mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.02% Proclin300, 1.0% 吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液；B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02% Proclin300, 2mM 的 4-碘苯酚, 0.1% 的 BSA, 0.1% 的溴化十六烷基三甲基铵, 10mM 鲁米诺溶液。

[0045] II 号试剂盒：

[0046] 其它同 I 号试剂盒，HRP 化学发光底物的配方为：A 液和 B 液各 1 瓶，其中 A 液

为的组成为:pH 值为 8.0,浓度为 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.05% Proclin300,0.5%吐温-20 和 10mM 过氧化脲溶液;B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.05% Proclin300,3mM 的 4-碘苯酚,1%的 BSA,1%的溴化十六烷基三甲基铵,50mM 鲁米诺溶液。

[0047] III 号试剂盒:

[0048] 其它同 I 号试剂盒,HRP 化学发光底物的配方为:A 液和 B 液各 1 瓶,其中 A 液为的组成为:pH 值为 8.0,浓度为 20mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.04% Proclin300,0.1%吐温-20 和 10mM 过氧化脲溶液;B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.04% Proclin300,2mM 的 4-碘苯酚,0.7%的 BSA,0.4%的溴化十六烷基三甲基铵,30mM 鲁米诺溶液。

[0049] 对照试剂盒:其它同 I 号试剂盒,而化学反光底物为市售化学发光底物(A 液为过氧化脲溶液,B 液为鲁米诺溶液,购自湖州英创生物科技有限公司)。

[0050] 3、本发明的试剂盒的使用方法

[0051] 1) 自 2-8℃冰箱中取出试剂盒,室温平衡 15 分钟。

[0052] 2) 取出包被板条,插入板架上。

[0053] 3) 每次试验设阴性对照、阴性对照、校准品各 2 孔每孔 50ul,预稀释 (1 : 100) 的待测样本 50ul,然后每孔加入 50ul FITC 标记抗原,振荡混匀后 37℃温育 30 分钟。

[0054] 4) 甩去反应液,每孔加满稀释后的洗涤液,洗板 5 次,最后在干净的吸水纸上扣干。

[0055] 5) 每孔分别加入 100 μ L 酶标记物,37℃温育 20 分钟。

[0056] 6) 甩去反应液,每孔加满稀释后的洗涤液,洗板 5 次,最后在干净的吸水纸上扣干。

[0057] 7) 各孔加化学发光底物液 A、B 各 50 μ L,用微量震荡器充分振荡混合均匀,室温 (20 ~ 25℃) 避光反应 5 分钟。

[0058] 8) 必须于加化学发光底物液后的第 5 ~ 30 分钟内测量,在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU),测量时间 1 秒 / 孔。

[0059] 9) 以校准品临界值,定性或半定量判定待测样本中是否存在肺炎支原体 IgM 抗体或其含量

[0060] 4、本发明的试剂盒与酶联免疫试剂的平行对比试验

[0061] 对正常对照样本 358 例,呼吸道感染样本 254 例(源自梧州市肿瘤防治研究所)采用本发明的试剂盒(化学发光法)与肺炎支原体 IgM 抗体检测试剂(酶联免疫法)(试剂盒购自广州贵翔)进行平行检测,检测程序和结果判断严格按照各试剂说明书进行。

[0062] 表 1. 肺炎支原体 IgM 抗体检测试剂(酶联免疫法)测定结果

组别	例数	+	-	阳性率 (%)
正常对照	358	23	335	6.42%
呼吸道感染	254	64	190	25.20%

[0063]

[0064] 表 2. 本发明的试剂盒测定结果

组 别	例数	+	-	阳性率 (%)
正常对照	358	25	333	6.98%
呼吸道感染	254	69	185	27.17%

[0066] 表 3. 本发明试剂盒与肺炎支原体 IgM 抗体检测试剂盒（酶联免疫法）比对

		酶免试剂盒		合计
		+	-	
本发明试剂盒	+	85	9	94
	-	2	516	518
合 计		87	525	612

[0068]

[0069] 表 1-3 所述数据表明,本发明试剂盒与对比酶联免疫检测试剂盒的阳性符合率为 90.4%,阴性符合率为 99.6%,两种检验方法的符合率为 98.2%。经验证,酶联免疫检测试剂盒检出 2 份假阳性、9 份假阴性,而本发明试剂盒检测结果与临床结果完全相符。

[0070] II 号试剂盒、III 号试剂盒对比检测实验结果与 I 号试剂盒相符。

[0071] 实施例 2. 本发明试剂盒发光底物与市售化学发光底物液对比试验

[0072] 对照试剂盒:与实施例 1 的试剂盒相同,区别在于化学发光底物采用市售常规的化学发光底物液(购自湖州英创生物科技有限公司)。

[0073] 步骤 1. 检测样本为实施例 1 中呼吸道感染样本 254 例及健康人血样。

[0074] 检测操作步骤同实施例 1 步骤 3 的使用方法。结果如下表所示。

[0075] 表 4. 本发明 I 号试剂盒化学发光底物与市场销售的化学发光底物比对

		对照发光底物		合计
		+	-	
本发明试剂盒 化学发光底物	+	86	8	94
	-	0	518	518
合 计		86	526	612

[0077] 表 4 所述数据表明,本发明 I 号试剂盒化学发光底物与对比化学发光底物的阳性符合率为 91.5%,阴性符合率为 100%,两种检验方法的符合率为 98.7%。经验证,对比发光底物检出 8 份假阴性,而本发明试剂盒检测结果与临床结果完全相符。

[0078] II 号试剂盒、III 号试剂盒对比检测实验结果与 I 号试剂盒相符,说明本发明比采用对照发光底物的试剂盒具有更高的检测灵敏性。

[0079] 步骤 2. 本发明的 I 号试剂盒、II 号试剂盒、III 号试剂盒 2-8℃保存 6 个月后, 用于检测步骤 1 的同一批样本, 结果显示, 阳性检出率未发生变化, 与临床验证结果相符率为 100%。而采用对照发光底物的试剂盒, 2-8℃保存 6 个月后, 假阴性比例由 8/94 提高到 11/94, 说明本发明的试剂盒中化学发光底物具有良好的稳定性, 适于批量大量生产, 检测结果稳定可靠。

专利名称(译)	检测肺炎支原体IgM抗体的化学发光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN102368071A	公开(公告)日	2012-03-07
申请号	CN201110183669.5	申请日	2011-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	彭京胜 焦守恕 李全		
发明人	彭京胜 焦守恕 李全		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/76		
代理人(译)	张涛		
其他公开文献	CN102368071B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明“检测肺炎支原体IgM抗体的化学发光免疫试剂盒”，属于医学检测试剂。包括抗异硫氰酸荧光素的单抗包被的微孔板，异硫氰酸荧光素标记的肺炎支原体抗原、辣根过氧化物酶标记的抗人IgM和化学发光底物。该方法优势在于本底背景低、特异性高、亲和力强，同时有效降低批间差异，在免疫检测领域具有较大的应用价值。

名称	数量
无水碳酸钠	1.6g
碳酸氢钠	2.9g
双蒸水	定容至 1000mL
调整 pH 值至 pH9.6	