



## (12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 106855569 A

(43)申请公布日 2017.06.16

(21)申请号 201611018728.2

(22)申请日 2016.11.21

(66)本国优先权数据

201620676844.2 2016.06.30 CN

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区南山街  
道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 王刚 程德淑 周羽 刘星 谢纳

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/576(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

### (54)发明名称

一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

### (57)摘要

本发明公开了一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:平滑肌抗原包被的磁微粒、鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯、抗平滑肌抗体IgG定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒的制备方法。本发明所述试剂盒与现有试剂盒相比具有操作简便,灵敏度高等特点。

1. 一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:平滑肌抗原包被的纳米磁微球、化学发光标记物、化学发光底物液、抗平滑肌抗体IgG定标品。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述平滑肌抗原包被的固相载体为磁微粒。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述平滑肌抗原包被的固相载体为羧基化的粒径为0.05-1 $\mu$ m磁微粒。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为吖啶酯、吖啶酯磺酰胺、吖啶酯甲苯磺酰胺、吖啶酯对甲基磺酰胺、吖啶酯三氟甲基磺酰胺。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物优选吖啶酯。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包括化学发光激发液、化学发光预激发液。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光预激发液为质量分数0.005% ~ 0.5%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液,激发液为0.005mol/L~0.025mol/L的氢氧化钠(NaOH)溶液。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗平滑肌抗体IgG定标品为用标准品缓冲液将抗平滑肌抗体IgG配制成浓度为0.05COI和5COI,4℃保存备用。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括平滑肌抗原包被的磁微粒的制备、鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯的制备、化学发光底物液的制备、抗平滑肌抗体IgG定标品的制备。

10. 根据权利要求1和权利要求9所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 平滑肌抗原包被的磁微粒的制备:

取羧基化的纳米磁珠悬浮液,磁分离去上清,MES缓冲液重悬,加入EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入平滑肌抗原,室温下混悬2-10h,磁分离,去除上清,Tris缓冲液重悬,得到平滑肌抗原包被的磁微粒;可选的,羧基化纳米磁珠直径为0.1 $\mu$ m~2.0 $\mu$ m;MES缓冲液浓度为10mM ~ 100mM,pH 5.5 ~ 8.5;

2) 鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯的制备:

取鼠抗人IgG抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吖啶酯混匀,室温下避光反应,1-2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯;

3) 抗平滑肌抗体IgG定标品的制备:

用标准品缓冲液将抗平滑肌抗体IgG配制成0.05COI 和5COI的样品,分装成1.0mL的小包装,4℃保存备用;

4) 化学发光预激发液的制备:

量取1.0升纯化水,依次加入0.5 ~ 100 $\mu$ L质量分数为20%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、0.5 ~ 5克防腐剂、0.5 ~ 5克表面活性剂,摇匀后避光存放;可选的,防腐剂为商品化叠氮化钠、PC300,表面活性剂为吐温20、吐温80、Triton X-100、Triton X-405;

5) 化学发光激发液的制备:

量取1.0升纯化水,依次加入0.2~1克氢氧化钠、0.5~5克防腐剂、0.5~5克表面活性剂,

摇匀后避光存放;可选的,防腐剂为商品化叠氮化钠、PC300,表面活性剂为吐温20、吐温80、Triton X-100、Triton X-405。

## 一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断免疫检测领域,具体地,本发明提供了一种抗平滑肌抗体IgG的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 抗平滑肌抗体(smooth muscle antibody,SMA)是自身免疫性肝炎的血清学标志抗体。在该疾病患者中SMA的阳性检出率可达90%。高滴度的SMA(大于1:1000)对诊断自身免疫性肝炎的特异性可达100%。在自身免疫肝炎患者,SMA主要为IgG型,而在原发性胆汁性肝硬化与自身免疫性肝炎重叠时,常以IgG和IgM型SMA同时出现。在肝外性胆汁堵塞,药物诱发性肝病、急性病毒性肝炎及肝癌患者中,SMA的阳性检出率极低,因此该抗体的检测有助于自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化的诊断及其他肝脏疾病的鉴别诊断。

[0003] SMA IgG亦见于其他一些疾病,如支原体肺炎、传染性单核细胞增多症、麻风、患皮肤黏膜淋巴结综合征的小儿、梅毒、干燥综合征、类风湿性关节炎等,肿瘤及病毒感染者也有不同程度的阳性检出率。

[0004] 临床检测抗平滑肌抗体IgG的常见方法有间接免疫荧光法、酶联免疫吸附法,但这些方法都存在一些不足之处。

#### [0005] 一、间接免疫荧光法

该法的基本原理是用特异性的抗体与载玻片中的抗原结合后形成抗原抗体复合物,继用荧光抗体与抗原抗体复合物结合,形成抗原抗体荧光复合物。在荧光显微镜下,根据复合物的发光情况来确定所检测的抗体。该方法评价:由于结合在抗原抗体复合物上的荧光抗体增多,发出的荧光亮度强,因而其敏感性强。但是其不足也是明显的:

- (1) 在分析结果时无法根据分子量的大小区分非特异性识别;
- (2) 操作相对复杂,需要价格较昂贵的荧光显微镜,在很多基层医院难以推广,也不太适用于标本量较多的实验室;
- (3) 荧光测定中的本底较高,荧光免疫技术用于定量测定有一定困难;
- (4) 结果判定需要有经验的专业人员,分析结果的客观性不足;
- (5) 只能进行定性检测,不能进行定量测定。

#### [0006] 二、酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)被广泛应用,但该方法也存在着下述的不足之处:

(1) 使用12×8型、6×8型、8×12型或整板型96孔专用微孔板作为抗原包被用具和反应容器,在使用时只能分成12批次、6批次、8批次或整板一次使用,无法进行独立的、单人份的检测;

(2) 定量测定所用的试剂种类较多,每一种检测试剂都要用试剂瓶来盛装,并且每使用一种试剂时都需要更换吸液嘴来分别加注到微孔板的微孔中,不但试剂瓶种类多,加注试剂的操作也极为繁琐;

(3) 缺少对检测信息的相应标注,只能通过查看试剂盒外包装盒的标识才能了解或知悉检测试剂的生产批号及有效期信息,而且所知悉的信息在检测过程中不受控,具有很大的随意性;

(4) 检测试剂在检测过程中处于开放的空间,容易引起各种试剂之间的交叉污染而影响检测结果的准确性;

(5) 检测过程多采用手工操作,试剂或样本的加量不很精确,操作过程极为繁琐和复杂,容易发生操作差错,检测结果的准确度和精密度较差;

(6) 在检测项目成套试剂的数量配置及使用上均为项目数 $\times 48/96$ 人份,如果需要检测10个项目,则试剂的配置及使用数须为 $10 \times 48/96$ 人份,如果只有一份样本需要检测10个不同的项目,也需要配置 $10 \times 48/96$ 人份的试剂,存在着不够经济合理的缺点。

## 发明内容

[0007] 目前抗平滑肌抗体IgG检测技术存在以下缺点:检测成本高、检测灵敏度低、重现性低、不能定量、操作复杂等。

[0008] 本发明正是为了克服以上所述缺点,公开了一种检测成本低、灵敏度高、重现性高、可以定量、操作简单的抗平滑肌抗体IgG试剂盒及其制备方法。本发明首先制备化学发光免疫分析试剂盒,主要包括:平滑肌抗原包被的磁颗粒、鼠抗人IgG抗体包被的吖啶酯以及抗平滑肌抗体IgG定标品;然后利用全自动化学发光免疫分析仪对定标品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件,测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度;最后对抗平滑肌抗体IgG全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、精密度、干扰性)的评价。

[0009] 本发明与目前技术相比,具有以下优点:

1、本发明选择吖啶酯作为标记材料,并应用于化学发光免疫分析系统,该发光体系为直接化学发光,与传统的酶促化学发光相比,该反应不需要酶的参与,更加节约成本;

2、本发明选用的吖啶酯化学发光免疫分析系统检测灵敏度高,能够达到0.9COI,相比其它的抗平滑肌抗体IgG检测方法灵敏度至少提高了8倍;

3、本发明选用的吖啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

4、本发明的化学发光免疫分析系统已实现样本的定量,通过内置标准曲线到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的浓度值;

5、本发明的化学发光免疫分析系统已实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

## 附图说明

[0010]

图1为实施例3得到的抗平滑肌抗体IgG标准曲线图。

[0011]

## 具体实施方式

## [0012]

实施例1:抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒制备方法

(1)平滑肌抗原包被的纳米磁珠制备:

取50mg羧基化的磁微粒(粒径为0.05-1 $\mu$ m)悬浮液,磁分离去上清,用0.02 M, pH为5.5 MES缓冲液重悬,加入0.5-2mL新配置的10 mg/mL的EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入3-5mg 平滑肌抗原,室温下混悬2-10h,磁分离,去除上清,用含2% BSA 的0.1 M pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到平滑肌抗原包被的磁颗粒,每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0013] (2)鼠抗人IgG标记的吖啶酯的制备:

取50 $\mu$ L 25mg/mL的鼠抗人IgG抗体,加入150  $\mu$ L 0.1-0.2 M pH 9.0-9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入1-2 $\mu$ L 5 mg/mL的吖啶酯混匀,室温下避光反应,1-2h后取出,用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯,每瓶5 mL分装保存于4℃备用。

[0014] (3)抗平滑肌抗体IgG定标品的制备:

用标准品缓冲液(40mM Tris-HCl, 0.5% BSA, 1% NaCl, pH 8.0)将抗平滑肌抗体IgG配制成成为0.05COI 和5COI的定标品,每瓶1.0mL分装冻干,4℃保存备用。

[0015] (4)化学发光预激发液的配制:

量取1.0升纯化水,依次加入80 $\mu$ L质量分数为20%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、1.0克叠氮化钠、1.5克吐温20,摇匀后避光存放。

[0016] (5)化学发光激发液的配制:

量取1.0升纯化水,依次加入0.6克氢氧化钠、0.5克PC 300、0.5克叠氮化钠、1.5克Triton X- 405,摇匀后避光存放。

[0017] 实施例2:抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测方法:

本发明以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,本发明的方法学模式为间接法,即仪器依次加入预稀释后的50 $\mu$ L的样品和50 $\mu$ L的平滑肌抗原包被的磁颗粒,反应10min后,进行磁分离,加入100 $\mu$ L鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯,反应10min后,再次进行磁分离,最后加入50 $\mu$ L化学发光预激发液、50 $\mu$ L化学发光激发液进行发光反应,记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的抗平滑肌抗体IgG含量。

[0018] 实施例3:抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒性能评价

检测曲线见附图1。

[0019] 灵敏度的检测:

参照CLSI EP17-A 文件推荐实验方案,计算抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫分析试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.9COI。

[0020] 精密度测定:

取浓度为3.2COI及12.5COI两个抗平滑肌抗体IgG样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%。

[0021] 干扰性实验:

取混合血清分别添加干扰物包括:对甘油三脂、胆红素、血红蛋白、总蛋白、HAMA、RF、

ANA,添加比例按照 1:20 进行,分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值,计算二者之间的偏差,以  $\pm 10\%$  为可接受范围。结果表明,干扰性均达到NCCLS的文件标准,可用于临床实验室抗平滑肌抗体IgG的准确评估。

**[0022] 实施例4:抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度对比实验**

分别用化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法对0C0I的校准品或样本稀释液进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出 $M+2SD$ ,将该发光值代入校准曲线计算得到相应的值。采用化学发光检测方法得到的值为0.9C0I,相对于传统的酶联免疫吸附法最低检测限提高了约8倍。

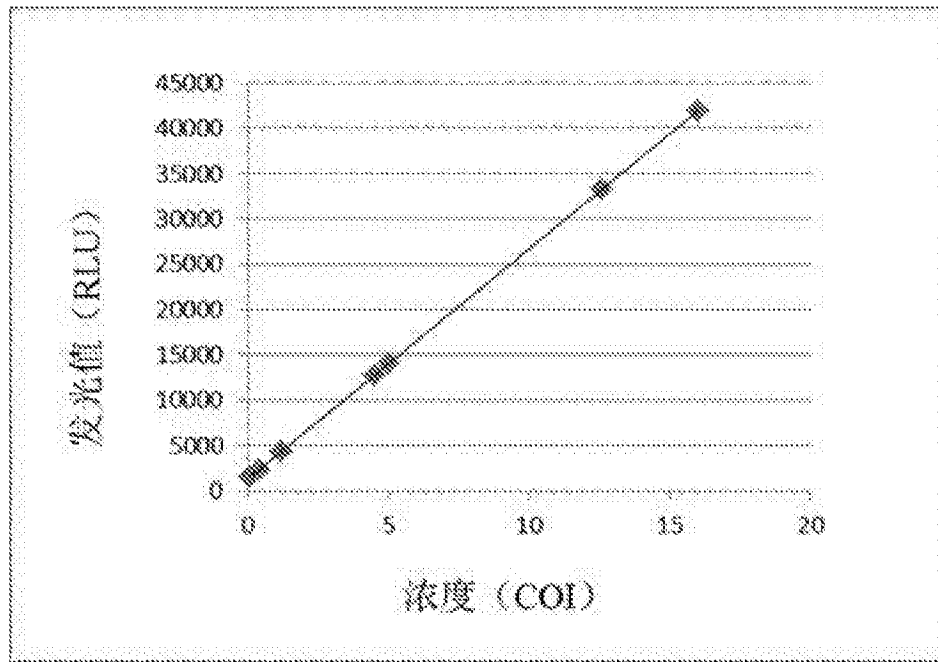


图1



专利名称(译)	一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106855569A</a>	公开(公告)日	2017-06-16
申请号	CN201611018728.2	申请日	2016-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	王刚 程德淑 周羽 刘星 谢纳		
发明人	王刚 程德淑 周羽 刘星 谢纳		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/576 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/76 G01N33/576		
优先权	201620676844.2 2016-06-30 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒，所述试剂盒包括：平滑肌抗原包被的磁微粒、鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯、抗平滑肌抗体IgG定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种抗平滑肌抗体IgG化学发光免疫检测试剂盒的制备方法。本发明所述试剂盒与现有试剂盒相比具有操作简便，灵敏度高等特点。