



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107102140 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201611018770.4

(22)申请日 2016.11.21

(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

申请人 深圳市人民医院

(72)发明人 陈巧红 杨永宏 王栋凯 刘星  
郑盛武

(51) Int. Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测  
试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种谷氨酸脱羧酶抗体化学  
发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:纯化的  
谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒工作液、吖啶酯标记  
的纯化的谷氨酸脱羧酶工作液、谷氨酸脱羧酶抗  
体定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开  
了一种谷氨酸脱羧酶抗体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,检测范围广等  
特点。

1. 一种谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:纯化的谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒工作液、吡啶酯标记的纯化的谷氨酸脱羧酶工作液、谷氨酸脱羧酶抗体定标品、预激发液、激发液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述谷氨酸脱羧酶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,所述谷氨酸脱羧酶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吡啶酯、吡啶酯磺酰胺、吡啶酯甲苯磺酰胺、吡啶酯对甲基磺酰胺、吡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吡啶酯。

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,所述谷氨酸脱羧酶抗体定标品为用标准品缓冲液将谷氨酸脱羧酶抗体配制成浓度为5 IU/mL、15 IU/mL、35 IU/mL、120 IU/mL、250 IU/mL、2000 IU/mL,分装冻干,4 °C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,其特征在于包括谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒的制备、谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯的制备、化学发光底物液的制备、谷氨酸脱羧酶抗体定标品的制备。

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) 谷氨酸脱羧酶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,加入谷氨酸脱羧酶,室温下混悬2-10 h,磁分离,去除上清, Tris缓冲液重悬,得到谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒;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) 谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯的制备:

取谷氨酸脱羧酶,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吡啶酯混匀,室温下避光反应,1-2 h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,最后加入得到的谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯;

3) 谷氨酸脱羧酶抗体定标品的制备:

用标准品缓冲液将谷氨酸脱羧酶抗体配置成浓度为5 IU/mL、20 IU/mL、100 IU/mL、400 IU/mL、800 IU/mL、2000 IU/mL,分装冻干,4 °C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 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、TritonX- 405。

## 一种谷氨酸脱羧酶抗体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,本发明提供了一种谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 谷氨酸脱羧酶(GAD)是合成 $\gamma$ 氨基丁酸(GABA)的限速酶,在胰岛 $\beta$ 细胞中与胰岛素同处存在,同时分泌,具有自分泌和旁分泌信号调节 $\beta$ 细胞合成及分泌胰岛素的功能。谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)阳性患者中,一方面由于体内存在GADA,GADA与GAD结合后影响了GABA的合成速度,干扰了胰岛素合成及分泌的调节,使胰岛 $\beta$ 细胞的胰岛素合成受到影响,导致体内循环中的胰岛素不足,从而引起胰岛素依赖的糖尿病。另一方面,机体产生的GADA激发了T淋巴细胞而引起 $\beta$ 细胞的破坏。

[0003] 绝大多数1型糖尿病是由免疫介导的胰岛 $\beta$ 细胞破坏造成的。这种选择性破坏与细胞免疫和体液免疫有关。除巨噬细胞、淋巴细胞浸润外,胰岛细胞抗体(ICA)、谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、胰岛素自身抗体(IAA)可以预报1型糖尿病的发病。在诸多自身抗体中,GADA出现早、持续时间长。在1型糖尿病诊断后3-5年,ICA抗体滴度和检出率显著下降,10年后仅20%的病人阳性。相反,GADA下降幅度小,1型糖尿病诊断10年后54%的病人仍能检出GADA。同时,与ICA相比,GADA测定简单,费用低,易于标准化。因此采用灵敏度高的GADA检测,可以尽可能多的从高危人群中诊断出1型糖尿病患者。

[0004] 成人晚发自身免疫性糖尿病(LADA)发病初期,临床特点与2型糖尿病很相似,但短短的数年内就依赖于胰岛素治疗,实质上为1型糖尿病,表现为低体重指数,ICA及其他一些自身抗体阳性。GADA作为LADA诊断的免疫学指标,要优于ICA。GADA检查有利于早期发现LADA病人,加强随诊,早期予以胰岛素治疗,可以保护残存的胰岛 $\beta$ 细胞功能,减少近期和远期并发症。

[0005] 2型糖尿病是由胰岛素抵抗和(或)相对缺乏造成的,并非免疫介导的胰岛炎所致。故2型糖尿病患者GADA阳性率低于1型糖尿病患者,在2型糖尿病中,最初即应用胰岛素的病人及GADA阴性的病人,其胰岛素 $\beta$ 细胞功能衰减幅度要低的多,高滴度的GADA预示着更快的胰岛 $\beta$ 细胞功能衰竭。因此,糖尿病发病时GADA的状态是预测其临床过程的理想指标,它可以将LADA与2型糖尿病区分开来。综上GADA的检测在糖尿病的预测,诊断及正确分型方面均具有重要价值。

[0006] 临床检测谷氨酸脱羧酶抗体的常见方法有间接免疫荧光法、酶联免疫吸附法,但 these 方法都存在着一些不足之处。

[0007] 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) 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;

(2) 荧光测定中的本底较高,只能进行定性检测,荧光免疫技术用于定量测定有一定困难;

(3) 结果判定需要有经验的专业人员,分析结果的客观性不足;

## 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。

## 发明内容

[0008] 目前谷氨酸脱羧酶抗体检测技术存在以下缺点:检测成本高、检测灵敏度低、检测线性范围窄、重现性低、不能定量、操作复杂等。

[0009] 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、检测线性范围广、重现性高、可以定量、操作简单的谷氨酸脱羧酶抗体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:谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒、谷氨酸脱羧酶包被的吡啶酯以及谷氨酸脱羧酶抗体定标品;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;最后对谷氨酸脱羧酶抗体全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、精密度、干扰性)的评价。

[0010] 本发明与目前技术相比,具有以下优点:

1、本发明选择吡啶酯作为标记材料,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、本发明选用的吡啶酯化学发光免疫分析系统检测灵敏度高,能够达到0.11 IU/mL,相比其它的谷氨酸脱羧酶抗体检测方法灵敏度至少提高了10倍;

3、本发明选用的吡啶酯化学发光免疫分析系统线性范围宽,能达到10-1500 IU/mL,其它的谷氨酸脱羧酶抗体化学发检测方法的检线性范围为20-1000 IU/mL;

4、本发明选用的吡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;

5、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;

6、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。

[0011]

## 附图说明

[0012]

图1为实施例3得到的谷氨酸脱羧酶抗体标准曲线图。

[0013]

## 具体实施方式

[0014]

实施例1:谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒制备方法

(1)谷氨酸脱羧酶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3-5 mg 谷氨酸脱羧,室温下混悬2-10 h,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,得到谷氨酸脱羧酶抗体单克隆抗体包被的磁微粒,每瓶5mL分装保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0015] (2)谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯的制备:

取50  $\mu$ L 2.5mg/mL的谷氨酸脱羧酶,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的吡啶酯混匀,室温下避光反应,1-2 h后取出,用2 mL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,最后加入得到的谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到谷氨酸脱羧酶标记的吡啶酯,每瓶5 mL分装保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0016] (3)谷氨酸脱羧酶抗体定标品的制备:

用标准品缓冲液(40 mM Tris-HCl, 0.5% BSA, 1% NaCl, pH 8.0)将谷氨酸脱羧酶抗体配置成浓度为5 IU/mL、20 IU/mL、100 IU/mL、400 IU/mL、800 IU/mL、2000 IU/mL,每瓶0.5 mL分装冻干,4  $^{\circ}$ C保存备用。

[0017] (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。

[0018] (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PC300、0.5g叠氮化钠、1.5克Triton X-405,摇匀后避光存放。

[0019] 实施例2:谷氨酸脱羧酶抗体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双抗原夹心法,即仪器依次加入25 uL的样品、50 uL的谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒以及50 uL的谷氨酸脱羧酶抗体包被的吡啶酯,反应10 min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入50uL化学发光预激发液、50uL化学发光激发液进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的谷氨酸脱羧酶抗体含量。

[0020] 实施例3:谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒性能评价

检测曲线见附图1。

[0021] 分析灵敏度的检测:

参照CLSI EP17-A 文件推荐实验方案,计算谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒的分析灵敏度,求得的分析灵敏度为0.11 IU/mL。

[0022] 线性的检测:

对浓度为5 IU/mL、20 IU/mL、100 IU/mL、400 IU/mL、800 IU/mL、2000 IU/mL 标准品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9996$ ,另外,该试剂盒对谷氨酸脱羧酶抗体样品检测的线性范围为5-2000 IU/mL。

[0023] 精密度测定:

取浓度为20 IU/mL和400 IU/mL 两个谷氨酸脱羧酶抗体样品,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%。

[0024] 干扰性实验:

取混合血清分别添加干扰物包括:胆红素、血红蛋白、抗坏血酸、甘油酯,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,可用于临床实验室谷氨酸脱羧酶抗体准确评估。

[0025] 实施例4:谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒的分析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浓度为0 IU/mL的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浓度值。采用化学发光检测方法得到的浓度值为0.11 IU/mL,相对于传统的酶联免疫吸附法分析灵敏度0.73 IU/mL,提高了约7倍。

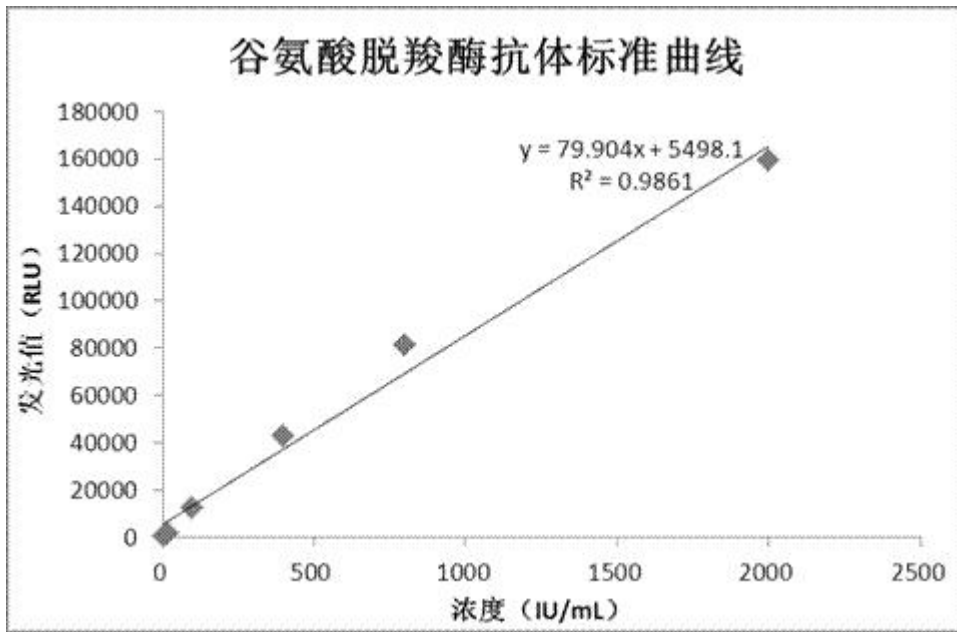


图1

专利名称(译)	一种谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107102140A</a>	公开(公告)日	2017-08-29
申请号	CN201611018770.4	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 深圳市人民医院		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司 深圳市人民医院		
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 深圳市人民医院		
[标]发明人	陈巧红 杨永宏 王栋凯 刘星 郑盛武		
发明人	陈巧红 杨永宏 王栋凯 刘星 郑盛武		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/532 G01N33/577 G01N2333/901 G01N2446/80 G01N2458/00 G01N2800/042		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种谷氨酸脱羧酶抗体化学发光免疫检测试剂盒，所述试剂盒包括：纯化的谷氨酸脱羧酶包被的磁微粒工作液、吖啶酯标记的纯化的谷氨酸脱羧酶工作液、谷氨酸脱羧酶抗体定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种谷氨酸脱羧酶抗体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，检测范围广等特点。

