



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108318698 A

(43)申请公布日 2018.07.24

(21)申请号 201710036305.1

(22)申请日 2017.01.17

(71)申请人 天津市协和医药科技集团有限公司

地址 300300 天津市滨海新区高新五路38号

(72)发明人 石牡丹 王立凯 张续

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代

理事务所 12201

代理人 陆艺

(51)Int.Cl.

G01N 33/72(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和人血红蛋白校准品;R1试剂包括甘氨酸缓冲液;PEG6000和ProClin-300;R2试剂包括:甘氨酸缓冲液、兔抗人血红蛋白包被的乳胶微球、牛血清白蛋白、Tween-20、海藻糖、ProClin-300;所述试剂R2中的乳胶微球的粒径为60-220nm,血红蛋白抗体为兔抗人血红蛋白多克隆抗体,与聚苯乙烯乳胶微球之间以共价偶联方式连接。本发明乳胶增强免疫比浊检测结果,客观反应出血量,便于观察病情变化;全自动操作模式,检测过程更加方便、快捷,可以批量式进行检验,更适用于大规模人群的筛查实验。

1. 一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒,其特征是包括R1试剂、R2试剂和人血红蛋白校准品;

所述R1试剂由下述组分组成:甘氨酸缓冲液0.1M;PEG60002wt%;ProClin-300 0.1wt%;pH=7.4;余量为水;

R2试剂由下述方法制成:

(1) 选取粒径为60-220nm的100mg聚苯乙烯羧基微球,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液清洗1-3次,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液稀释至10ml;

(2) 向步骤(1)获得的10ml悬浮液中加入1~6mg的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀,加入1~2mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光搅拌下反应15~30min,15000rpm,离心15-45min,弃上清;

(3) 用9ml的pH=8.0的硼酸缓冲液重悬步骤(2)获得的离心产物,以超声2秒间隔2秒的方式超声处理,至悬浮液均一,加入0.1~3.0mg抗人血红蛋白多克隆抗体,在搅拌下反应2~4h,15000rpm,离心15-30min,弃上清。

(4) 向步骤(3)获得的离心产物中加入10ml封闭液,在旋转混匀仪上反应30-60min,所述封闭液的组成为20mM的pH=7.4的PBS、1wt%牛血清白蛋白、0.5wt%ProCline-300,余量为水;

(5) 15000rpm,离心15-45min,弃上清,离心产物用50mM的pH=7.2的PBS清洗2-3次,离心;

(6) 向步骤(5)获得的离心产物中加入10ml的保存液超声悬浮,得到抗人血红蛋白多克隆抗体包被的乳胶微球,所述保存液的组成为:0.01M~0.1M甘氨酸缓冲液、0.1wt%~1wt%牛血清白蛋白、0.5wt%~2wt%Tween-20、1wt%~5wt%海藻糖、0.05wt%~0.5wt% ProClin-300,pH=7.0~9.0;余量为水。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征是所述人血红蛋白校准品为人血红蛋白用pH=7.2、改良的PBS缓冲液进行稀释,稀释至人血红蛋白的浓度分别为0ng/ml、50ng/ml、200ng/ml、500ng/ml和1000ng/ml,震荡均匀,所述改良的PBS缓冲液中含50mMPBS、0.5wt%牛血清白蛋白、0.2wt%EDTA、0.1wt%NaN₃和0.9wt%NaCl。

一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及临床体外试剂检验领域,具体涉及到一种便潜血乳胶增强免疫比浊法检测试剂盒。

背景技术

[0002] 结直肠癌是当今最常见的疾病之一,每年全球有约120万名患者被确诊为结直肠癌,而有超过60万名患者直接或间接死于结直肠癌。在我国,结直肠癌的发病率和死亡率分别位于恶性肿瘤的第3和第4位,每年发病递增速度为世界平均数的2倍,并且结直肠癌患者的5年存活率却长期徘徊于较低水平,其主要原因是多数医院收治的结直肠癌中,早期癌所占比例过低。因此,提高早期诊断水平是提高结直肠癌患者生存率的重要环节。国外研究结果和国内的普查经验均显示,自然人群普查是提高结直肠癌早期诊断最有效的方法,也是提高结直肠癌患者生存率、降低发病率的重要途径。

[0003] 美国癌症协会和联邦大肠癌组对大肠癌筛查方法的推荐主要有两类:(1)初筛,如化学法粪便隐血(便隐血feces occult blood,FOB又称便潜血)实验、免疫法粪便隐血实验、粪便DNA检测。(2)包括内窥镜检查和放射成像检查,如乙状结肠镜检查、纤维结肠镜、双重气钡对比造影以及CT仿真内镜。结肠镜对直肠癌诊断的敏感性和特异性达90%和97%,并可对病变进行精确定位,但由于操作较复杂,费用相对昂贵,并且被检测者可能会出现并发症,目前不作为大系列人群早期筛查直肠癌的常规方法。

[0004] 现有技术中,临床常用便潜血试验主要有化学法和免疫学方法两种。化学法:自1864, VanDeen首先使用了愈创木脂作为检验便潜血的指示物,接连出现匹拉米洞、无色孔雀绿、邻甲联苯胺法等作为指示物,其原理为血红蛋白中的亚铁血红素有过氧化氢酶活性,催化过氧化氢释放新生态氧,使底物显色。化学法虽检测方便,结果清楚,但方法上缺乏特异性和准确性,且受其他干扰因素多、假阳性率高。免疫学方法常见为胶体金法,以血红蛋白为检测指标,胶体金法的灵敏度低,无法对待测物进行定量分析仍是该方法一直存在的缺点,且现市面上使用的胶体金法检测试剂盒灵敏度较高的为血红蛋白含量超过100ng/ml才显示阳性,而低于100ng/ml检测结果为阴性,这一定程度上造成漏检。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种制备成本低廉、稳定性好、检测灵敏度高、能定量检测便潜血的一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒。

[0006] 本发明的技术方案概述如下:

[0007] 一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和人血红蛋白校准品;

[0008] 所述R1试剂由下述组分组成:甘氨酸缓冲液0.1M;PEG60002wt%;ProClin-300 0.1wt%;pH=7.4;余量为水;

[0009] R2试剂由下述方法制成:

[0010] (1) 选取粒径为60-220nm的100mg聚苯乙烯羧基微球,用50mM的pH=5.5的MES缓冲

液清洗1-3次,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液稀释至10ml;

[0011] (2) 向步骤(1)获得的10ml悬浮液中加入1~6mg的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀,加入1~2mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光搅拌下反应15~30min,15000rpm,离心15-45min,弃上清;

[0012] (3) 用9ml的pH=8.0的硼酸缓冲液重悬步骤(2)获得的离心产物,以超声2秒间隔2秒的方式超声处理,至悬浮液均一,加入0.1~3.0mg抗人血红蛋白多克隆抗体,在搅拌下反应2~4h,15000rpm,离心15-45min,弃上清。

[0013] (4) 向步骤(3)获得的离心产物中加入10ml封闭液,在旋转混匀仪上反应30-60min,所述封闭液的组成为20mM的pH=7.4的PBS、1wt%牛血清白蛋白、0.5wt%ProCline-300,余量为水;

[0014] (5) 15000rpm,离心15-45min,弃上清,离心产物用50mM的pH=7.4的PBS清洗2-3次,离心;

[0015] (6) 向步骤(5)获得的离心产物中加入10ml的保存液超声悬浮,得到抗人血红蛋白多克隆抗体包被的乳胶微球,所述保存液的组成为:0.01M~0.1M甘氨酸缓冲液、0.1wt%~1wt%牛血清白蛋白、0.5wt%~2wt%Tween-20、1wt%~5wt%海藻糖、0.05wt%~0.5wt%ProClin-300,pH=7.0~9.0;余量为水。

[0016] 人血红蛋白校准品为人血红蛋白用pH=7.2、改良的PBS缓冲液进行稀释,稀释至人血红蛋白的浓度分别为0ng/ml、50ng/ml、200ng/ml、500ng/ml和1000ng/ml,震荡均匀,所述改良的PBS缓冲液中含50mMPBS、0.5wt%牛血清白蛋白、0.2wt%EDTA、0.1wt%NaN₃和0.9wt%NaCl。

[0017] 本发明的优点:

[0018] (1) 操作简单便捷,能在几分钟内快速、准确地检测人血红蛋白含量,真实反映病情进展和评估治疗效果,对于疾病的早期诊断和治疗具有重要的临床意义;

[0019] (2) 不易受人为操作和外界因素干扰,检测稳定性和重复性都很好;

[0020] (3) 提高人群结直肠癌和进展期腺瘤的检出率,减少结肠癌的漏诊率;

[0021] (4) 能利用普通的生化分析仪进行检测,容易实现自动化,可在各级基层医疗机构普及和应用,能够进行大批量样本的检测,更适用于大规模人群的筛查实验。

附图说明

[0022] 图1为7080全自动生化分析仪测定的标准曲线图,横坐标为血红蛋白抗原浓度,纵坐标为OD660nm吸光度变化值。

具体实施方式

[0023] 本发明所使用的抗体包被方法为生成NHS-酯的中间体两步法,该方法是通过化学交联剂在活化缓冲液中进行的,所用的化学交联剂优先选择了碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)(购自Sigma),N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)(购自Aladdin)。

[0024] 抗人血红蛋白多克隆抗体为兔抗人血红蛋白多克隆抗体。人血红蛋白为天然蛋白,均购自于天健生物制药有限公司。

[0025] 本发明的试剂盒要配合全自动生化分析仪使用,如荣研OC-sensor micro,日立

7080等,本发明使用的是日立7080。

[0026] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

[0027] 实施例1

[0028] R1试剂的制备:

[0029] 甘氨酸缓冲液0.1M;PEG60002wt%;ProClin-300 0.1wt%;pH=7.4;余量为水;称取甘氨酸7.507g;PEG6000 20g;ProClin-300 1g;加水500ml溶解混匀;用3M的NaOH水溶液调节pH至7.4±0.1;加水定容至1L。

[0030] 实施例2

[0031] R2试剂由下述方法制成:

[0032] (1) 取粒径为60nm (JSR公司,羧基含量0.187meq/g) 100mg聚苯乙烯羧基微球,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液清洗2次,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液稀释至10ml;

[0033] (2) 向步骤(1)获得的10ml悬浮液中加入3mg的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀,加入2mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光搅拌下反应30min,15000rpm,离心45min,弃上清;

[0034] (3) 用9ml的pH=8.0的硼酸缓冲液重悬步骤(2)获得的离心产物,以超声2秒间隔2秒的方式超声处理,至悬浮液均一,加入0.5mg兔抗人血红蛋白多克隆抗体,在搅拌下反应3h,15000rpm,离心30min,弃上清。

[0035] (4) 向步骤(3)获得的离心产物中加入10ml封闭液,在旋转混匀仪上反应40min,所述封闭液的组成为20mM的pH=7.4的PBS、1%牛血清白蛋白、0.5%ProCline-300,余量为水;

[0036] (5) 15000rpm,离心45min,弃上清,离心产物用50mM的pH=7.4的PBS清洗3次,离心;

[0037] (6) 向步骤(5)获得的离心产物中加入10ml的保存液超声悬浮,得到兔抗人血红蛋白多克隆抗体包被的乳胶微球,所述保存液的组成为:0.02M甘氨酸缓冲液、0.5wt%牛血清白蛋白、0.5wt%Tween-20、1wt%海藻糖、0.1wt%ProClin-300,pH=7.4;余量为水。

[0038] 实施例3

[0039] R2试剂由下述方法制成:

[0040] (1) 取粒径为145nm (JSR公司,羧基含量0.104meq/g) 100mg聚苯乙烯羧基微球,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液清洗1次,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液稀释至10ml;

[0041] (2) 向步骤(1)获得的10ml悬浮液中加入1mg的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀,加入2mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光搅拌下反应15min,15000rpm,离心20min,弃上清;

[0042] (3) 用9ml的pH=8.0的硼酸缓冲液重悬步骤(2)获得的离心产物,以超声2秒间隔2秒的方式超声处理,至悬浮液均一,加入3.0mg兔抗人血红蛋白多克隆抗体,在搅拌下反应4h,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0043] (4) 向步骤(3)获得的离心产物中加入10ml封闭液,在旋转混匀仪上反应30min,所述封闭液的组成为20mM的pH=7.4的PBS、1wt%牛血清白蛋白、0.5wt%ProCline-300,余量为水;

[0044] (5) 15000rpm,离心30min,弃上清,离心产物用50mM的pH=7.4的PBS清洗3次,离

心；

[0045] (6) 向步骤(5)获得的离心产物中加入10ml的保存液超声悬浮,得到兔抗人血红蛋白多克隆抗体包被的乳胶微球,所述保存液的组成为:0.01M甘氨酸缓冲液、0.1wt%牛血清白蛋白、0.5wt%Tween-20、1wt%海藻糖、0.05wt%ProClin-300,pH=7.0;余量为水。

[0046] 实施例4

[0047] R2试剂由下述方法制成:

[0048] (1) 取粒径为220nm(JSR公司,羧基含量0.085meq/g)100mg聚苯乙烯羧基微球,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液清洗3次,用50mM的pH=5.5的MES缓冲液稀释至10ml;

[0049] (2) 向步骤(1)获得的10ml悬浮液中加入6mg的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀,加入1mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光搅拌下反应30min,15000rpm,离心15min,弃上清;

[0050] (3) 用9ml的pH=8.0的硼酸缓冲液重悬步骤(2)获得的离心产物,以超声2秒间隔2秒的方式超声处理,至悬浮液均一,加入0.1mg兔抗人血红蛋白多克隆抗体,在搅拌下反应2h,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0051] (4) 向步骤(3)获得的离心产物中加入10ml封闭液,在旋转混匀仪上反应60min,所述封闭液的组成为20mM的pH=7.4的PBS、1%牛血清白蛋白、0.5%ProCline-300,余量为水;

[0052] (5) 15000rpm,离心15min,弃上清,离心产物用50mM的pH=7.4的PBS清洗2次,离心;

[0053] (6) 向步骤(5)获得的离心产物中加入10ml的保存液超声悬浮,得到兔抗人血红蛋白多克隆抗体包被的乳胶微球,所述保存液的组成为:0.1M甘氨酸缓冲液、1wt%牛血清白蛋白、2wt%Tween-20、5wt%海藻糖、0.5wt%ProClin-300,pH=7.4;余量为水。

[0054] 实施例5

[0055] 人血红蛋白校准品的制备:人血红蛋白用pH=7.2、改良的PBS缓冲液进行稀释,稀释至人血红蛋白的浓度分别为0ng/ml、50ng/ml、200ng/ml、500ng/ml和1000ng/ml,震荡均匀,所述改良的PBS缓冲液中含50mMPBS、0.5wt%牛血清白蛋白、0.2wt%EDTA、0.1wt%NaN₃和0.9wt%NaCl。

[0056] 实施例6

[0057] 一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒,包括实施例制备的R1试剂、实施例2制备的R2试剂和实施例5制备的人血红蛋白校准品。

[0058] 试剂盒的使用方法:

[0059] 试剂在测定前,先按照下表的参数对日立7080全自动生化分析仪进行设置,并按照该生化仪的使用规范,将试剂R1、试剂R2和5个不同浓度的校准品放入试剂盘的正确位置后,进行定标,定标完成后便可对样品进行测试。

[0060] 表1

[0061]

R1: R2: Sample	主波长/副波长	反应方向	读点	定标类型
240:40:20	550/720	(+) increase	19-31	5AB/Spline

[0062] 定标曲线见图1。

[0063] 实施例7

[0064] 一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒,包括实施例制备的R1试剂、实施例3制备的R2试剂和实施例5制备的人血红蛋白校准品。

[0065] 试剂盒的使用方法同实施例6。

[0066] 实施例8

[0067] 一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒,包括实施例制备的R1试剂、实施例4制备的R2试剂和实施例5制备的人血红蛋白校准品。

[0068] 试剂盒的使用方法同实施例6。

[0069] 实施例9

[0070] 用实施例6、7、8试剂盒分别对一批经医院确诊为结肠癌患者、直肠癌患者、肠息肉患者、消化道出血患者、健康者的标本进行测定,实验结果如下:

[0071] 表2

[0072]

采集对象	标本份数	阳性例数		
		实施例 6	实施例 7	实施例 8
结肠癌患者	150	139	142	148
直肠癌患者	250	240	241	248
肠息肉患者	80	75	78	80
消化道出血患者	220	211	219	219
健康者	300	0	0	0

[0073] 如上表所示,试剂盒对阴性标本的检测结果正确率为100%,对阳性样本的检测率维持在90%以上,所以本试剂盒在对结直肠癌的筛查中能够起到重要作用。

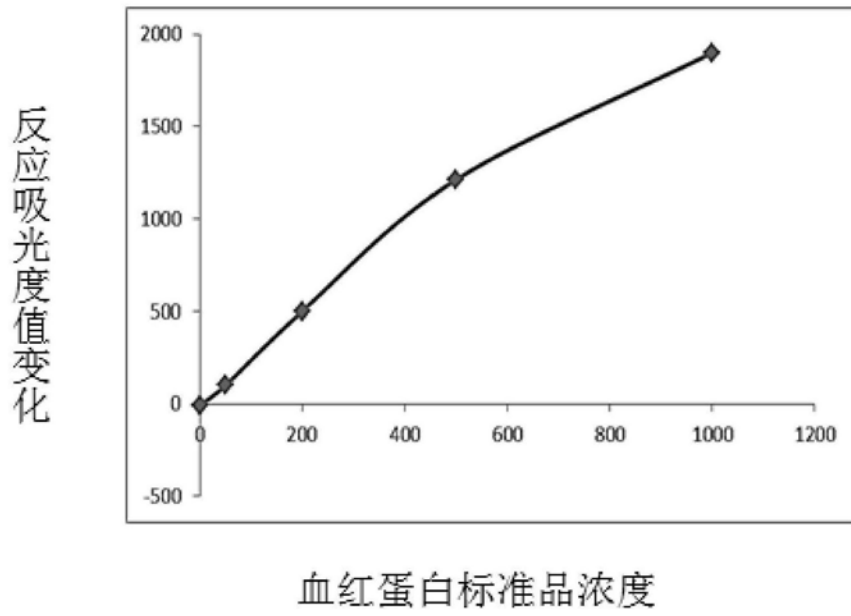


图1

专利名称(译)	一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒		
公开(公告)号	CN108318698A	公开(公告)日	2018-07-24
申请号	CN201710036305.1	申请日	2017-01-17
[标]发明人	石牡丹 王立凯 张续		
发明人	石牡丹 王立凯 张续		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/721 G01N33/531		
代理人(译)	陆艺		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种便潜血乳胶增强免疫比浊试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和人血红蛋白校准品；R1试剂包括甘氨酸缓冲液；PEG6000和ProClin-300；R2试剂包括：甘氨酸缓冲液、兔抗人血红蛋白包被的乳胶微球、牛血清白蛋白、Tween-20、海藻糖、ProClin-300；所述试剂R2中的乳胶微球的粒径为60-220nm，血红蛋白抗体为兔抗人血红蛋白多克隆抗体，与聚苯乙烯乳胶微球之间以共价偶联方式连接。本发明乳胶增强免疫比浊检测结果，客观反应出血量，便于观察病情变化；全自动操作模式，检测过程更加方便、快捷，可以批量式进行检验，更适用于大规模人群的筛查实验。

R1: R2: Sample	主波长/副波长	反应方向	读点	定标类型
240:40:20	550/720	(+) increase	19-31	5AB/Spline