



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103076455 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201210575603. 5

(22) 申请日 2012. 12. 26

(73) 专利权人 上海奥普生物医药有限公司

地址 201203 上海市浦东新区碧波路 328 号
C 座 3 楼

(72) 发明人 杨晶 沈旭辉 翟小杰

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务
所 31233

代理人 黄志达

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

审查员 刘迎鸣

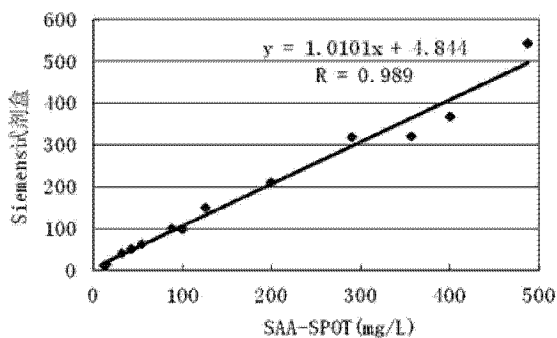
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒及其制备和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫胶体金法快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒及其制备和应用, 试剂盒包括冻干抗 SAA 免疫胶体金、反应板、样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液。制备方法包括:(1)首先制备胶体金和抗 SAA 免疫胶体金缀合物;制备冻干抗 SAA 免疫胶体金;(2)分别按比例配制样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液,制备反应板,组装成品即得试剂盒。本发明可以在人体发生疾病时医生当场可获知 SAA 测定结果,能快速判断病人病情,从而更有针对性的对病人进行有效处理,缩短治愈时间,降低医疗费用,具有良好的应用前景。



1. 一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A(SAA) 试剂盒,其特征在於:所述试剂盒包括冻干抗 SAA 免疫胶体金、反应板、样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液;其中,封闭液的组成为:1000ml 纯化水中含有 2.0-4.0g 十二水磷酸氢二钠、0.1-0.5g 二水磷酸二氢钠、5~10g NaCl 和 1.5g NaN_3 , pH 7.0~9.0;样品稀释液的组成为:1000ml 纯化水中含有 0.5~2g 甘氨酸、4.0~6.0ml 的 1mol/L NaOH 溶液和 0.5g NaN_3 , pH 7.0~9.0;冻干胶体金复溶液的组成为:1000ml 超纯水中含有 5-10g NaCl 和 0.5g NaN_3 ;洗涤液的组成为:1000ml 纯化水中含有 2.0-4.0g 十二水磷酸氢二钠、0.1-0.5g 二水磷酸二氢钠、5~10g NaCl 和 0.5g NaN_3 , pH 7.0~9.0;反应板为胶体金定量检测板,反应板上的硝基纤维膜由针对另一反应决定簇的另一纯化 SAA 单抗或多抗包被;所述试剂盒的具体使用步骤如下:

(1) 从冷藏处取出冻干抗 SAA 免疫胶体金,室温平衡,在冻干抗 SAA 免疫胶体金中,加入标贴或说明书中规定体积的冻干胶体金复溶液摇匀;

(2) 待测样品加入样品稀释液进行 40-480 倍稀释,充分混匀;

(3) 将反应板平放于实验台上,于反应孔内滴加封闭液,待完全渗入;

(4) 吸取稀释样品到反应板上,待完全渗入后,将步骤(1)得到的金标液加入到反应板孔中;

(5) 待完全渗入后,加入洗涤液;

(6) 待洗涤液完全渗入后,于 5 分钟内在 Qpad 金标定量仪 SAA 项目下测度 SAA 值;

(7) Upper Qpad 金标法定量读数仪按仪器说明书操作。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒,其特征在於:所述冻干抗 SAA 免疫胶体金由 SAA 单抗包被于胶体金制成。

3. 一种如权利要求 1~2 中任一所述的快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒的制备方法,包括:

(1) 首先制备胶体金和抗 SAA 免疫胶体金缀合物;2500ml 胶体金在包被离心洗涤后,加入磷酸盐缓冲液得到 1500ml 抗 SAA 免疫胶体金应用液;冷冻干燥、抽真空,即得冻干抗 SAA 免疫胶体金;

(2) 分别按比例配制样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液,制备反应板,组装成品即得试剂盒。

4. 根据权利要求 3 所述的一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒的制备方法,其特征在於:所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005-0.02mol/L, pH 值为 7.0~8.0。

快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于临床免疫学检测领域,特别涉及一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒及其制备和应用。

背景技术

[0002] 血清淀粉样蛋白 A (serum amyloidA, SAA) 是由同一簇基因编码的一组多形性蛋白,它是淀粉样变组织中沉积的淀粉样蛋白 A 的前体,属于急性时相反应蛋白(Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant[J]. Eur J Biochem, 1999, 265(2):501-523)。SAA 在炎症或感染急性期(48~72h)可迅速升高,并在疾病的恢复期迅速下降(Urieli SS, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states[J]. Hematology, 2000, 7(1):64-69), 例如在病毒感染(R. Shaikin-Kestenbaum, S. Zimlichman, Y. Winkoff, M. Pras, C. Chaimovitz & I. Sarov, Serum amyloid A (SAA) in Patients with Infections Due to Cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus, and Herpes Simplex Virus[J]. Infectious Diseases, 1982, 146(3):443)、心血管疾病(Lannergård A, Larsson A, Friman G, et al. Human serum amyloid A (SAA) and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) in preterm newborn infants with nosocomial infections[J]. Acta Paediatr, 2008, 97(8):1061-1065)、肿瘤(Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: An acute-phase protein involved in tumour pathogenesis[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(1):9-26)等疾病。研究发现, SAA 与 C-反应蛋白相比,其灵敏度、特异度更高(陆召辉,戴路明,血清淀粉样蛋白 A 在呼吸系统疾病中的研究进展[J]. 国家呼吸杂志, 2009, 29(1):47-50), 尤其是在早期病毒感染时, SAA 变化较 CRP 更敏感,有助于对细菌感染与病毒感染的鉴别诊断(卢庆文,三种急性时相反应蛋白测定在急性呼吸道感染鉴别中的应用价值, [J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(19):3725-3726; H. Miwata, T. Yamada, M. Okada, T. Kudo, H. Kimura, T. Morishima, Serum Amyloid A Protein in Acute Viral Infections[J]. Archives of Disease in Childhood, 1993, 68:210-214); 且在移植排斥反应(JG. Raynes, EH. Cooper, Comparison of Serum Amyloid A Protein and C-reactive Protein Concentrations in Cancer and Non-malignant Disease[J]. Clin. Pathol., 1983, 36:798-803)等疾病中均有体现,为临床诊断提供更好的参考价值。

[0003] 目前,国内外已有多种方法用于检测血清中的 SAA,如酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、放射性免疫测定法(Radioimmunoassay, RIA)、乳胶增强的速率散射比浊法、微球酶免疫法(Microspheres Enzyme Immunoassay, MEIA)等。然而,目前国内经国家食品药品监督管理局(State Food and Drug Administration, SFDA)批准用于临床标本 SAA 检测的试剂只有采用乳胶增强速率散射比浊法在配套的蛋白分析仪上(国食药监械(进)字 2012 第 2403367 号)使用。由于其检测成本相对较高、需特殊仪器等原因, SAA 检测尚未在临床中广泛应用。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒及其制备和应用,该试剂盒可以在人体发生疾病时医生当场可获知 SAA 测定结果,能快速判断病人病情,从而更有针对性的对病人进行有效处理,缩短治愈时间,降低医疗费用,具有良好的应用前景。

[0005] 本发明的一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒,所述试剂盒包括冻干抗 SAA 免疫胶体金、反应板、样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液。

[0006] 所述冻干抗 SAA 免疫胶体金由 SAA 单抗包被于胶体金制成。

[0007] 所述反应板为胶体金定量检测板,反应板上的硝基纤维膜由针对另一反应决定簇的另一纯化 SAA 单抗或多抗包被。

[0008] 样品稀释液:

	原料名称	用量
	甘氨酸	0.5-2g
[0009]	1M NaOH	4-6ml
	NaN ₃	0.5g
	纯化水	1000ml
	pH 7.0~9.0	

[0010] 冻干胶体金复溶液:

	原料名称	用量
	NaCl	5-10g
[0011]	NaN ₃	0.5g
	超纯水	1000ml

[0012] 洗涤液:

	原料名称	用量
	磷酸氢二钠 (十二水)	2.0-4.0g
[0013]	磷酸二氢钠 (二水)	0.1-0.5g
	NaCl	5-10g
	NaN ₃	0.5g
[0014]	纯化水	1000ml
	PH 7.0~8.0	

[0015] 封闭液:

	原料名称	用量
	NaCl	5-10g
	NaN ₃	1.5g
[0016]	磷酸氢二钠 (十二水)	2.0-4.0g
	磷酸二氢钠 (二水)	0.1-0.5g
	纯化水	1000ml
PH 7.0~8.0		

[0017] 本发明的一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒的制备方法,包括:

[0018] (1)首先制备胶体金和抗 SAA 免疫胶体金缀合物(量取 2500ml 双蒸水放入 5000ml 三角烧瓶内,与适量玻璃珠共同加热至沸,在沸腾状态下加入 1% 柠檬酸三钠溶液(加入量随小试确定),后再加入 1% 氯化金溶液,共煮沸 10-20 分钟,置室温冷却,液体呈澄清透明酒红色。向上述已冷却到室温的胶体金溶液内,按比例放大加入初测试确证过的 K₂CO₃溶液量调节 PH,混匀,再按初测试比例加入 SAA 单抗,混匀,中间摇动数次,再加入相当于前一次一半量的 K₂CO₃溶液,及 1%Carbowax 溶液,使其终浓度为 0.1~0.5mg/ml 以保护胶体金,结束反应。)2500ml 胶体金在包被离心洗涤后,加入磷酸盐缓冲液得到 1500ml 抗 SAA 免疫胶体金应用液;冷冻干燥、抽真空,即得冻干抗 SAA 免疫胶体金;

[0019] (2)分别按比例配制样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液,制备反应板,组装成品即得试剂盒。

[0020] 所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005-0.02mol/L, pH 值为 7.0~8.0。

[0021] 本发明的一种快速定量检测血清淀粉样蛋白 A 试剂盒的应用,具体使用步骤如下:

[0022] (1)从冷藏处取出抗 SAA 金标液冻干品,室温平衡,在抗 SAA 金标液冻干品中,加入标贴或说明书中规定体积的冻干品复溶液摇匀;

[0023] (2)待测样品加入样品稀释液进行 40-480 倍稀释,充分混匀;

[0024] (3)将反应板平放于实验台上,于反应孔内滴加封闭液,待完全渗入;

[0025] (4)吸取稀释样品到反应板上,待完全渗入后,将步骤(1)得到的金标液加入到反应板孔中;

[0026] (5)待完全渗入后,加入洗涤液;

[0027] (6)待洗涤液完全渗入后,于 5 分钟内在 Qpad 金标定量仪 SAA 项目下测度 SAA 值;

[0028] (7)Upper Opad 金标法定量读数仪按仪器说明书操作。

[0029] 胶体金法作为一种广泛应用的免疫学检测方法因其快速、简便,在医院检验科已广泛应用,本发明的试剂盒,根据美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)颁布的 EP 文件对其各项分析性能(包括准确性、精密度、检测限、线性范围及参考区间等)进行了验证,其中相较于西门子试剂盒,本发明试剂盒测试速度更快(3 分钟内即可得出结果)、单个检验成本更低、操作方便简单、符合即时检验 POCT (point-of-care testing) 类型产品的主要特点;西门子试剂盒上机默认 SAA 测试范围为 100~200mg/L(按批号各不相同),标本测试值高于该浓度需要重新稀释,增加临床应用成本,本发明试剂盒默认读数范围 5-500mg/L 较西门子试剂盒范围更广;且本发明测

试标本类型包括血清、血浆和全血, 相较西门子试剂盒更广泛。

[0030] 该试剂盒的主要反应原理为双抗体固相夹心法胶体金免疫斑点渗滤法, 检测血清、血浆、全血标本经 40-480 倍稀释后流经本试剂盒的反应板中的硝基纤维素膜时, 其中所含的 SAA 能为膜上固定的抗 SAA 单抗或多抗特异性地捕获, 并专一性地与随后加入的红色胶体金——抗 SAA 另一决定簇单抗缀合物结合, 呈红色斑点(固定在膜上的抗待测物单抗或多抗与缀合胶体金的抗待测物单抗是二株不同的抗体, 有不同的结合位点), 斑点红色强度可用仪器定量测试, 它与样品中 SAA 浓度呈正比。

[0031] 有益效果

[0032] 本发明可以在人体发生疾病时医生当场可获知 SAA 测定结果, 能快速判断病人病情, 从而更有针对性的对病人进行有效处理, 缩短治愈时间, 降低医疗费用, 具有良好的应用前景。

附图说明

[0033] 图 1 为 SAA-SPOT 和 SIEMENS 血清淀粉样蛋白 A 测定试剂盒(散射比浊法) 定量的结果比对;

[0034] 图 2 为 SAA-SPOT 在 Qpad 上的标准曲线图。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解, 在阅读了本发明讲授的内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0036] 实施例 1

[0037] 1. 冷冻干燥抗 SAA 免疫胶体金和反应板的制备: 按吕绳凯等介绍的方法(中华微生物学和免疫学杂志, 13 (2): 125, 1993; 上海医学检验杂志, 5 (1): 62, 1990) 制备胶体金和抗 SAA 免疫胶体金缀合物。(量取 2500ml 双蒸水放入 5000ml 三角烧瓶内, 与适量玻璃珠共同加热至沸, 在沸腾状态下加入 1% 柠檬酸三钠溶液(加入量随小试确定), 后再加入 1% 氯化金溶液, 共煮沸 10-20 分钟, 置室温冷却, 液体呈澄清透明酒红色。向上述已冷却到室温的胶体金溶液内, 按比例放大加入初测试确证过的 K_2CO_3 溶液量调节 PH, 混匀, 再按初测试比例加入 SAA 单抗, 混匀, 中间摇动数次, 再加入相当于前一次一半量的 K_2CO_3 溶液, 及 1% Carbowax 溶液, 使其终浓度为 0.1 ~ 0.5mg/ml 以保护胶体金, 结束反应。) 0.1mg~0.5mg SAA 单抗用于包被 10ml 胶体金, 2500ml 胶体金在包被离心洗涤后, 最终以 pH7.4, 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液恢复到 1500ml 抗 SAA 免疫胶体金应用液。冷冻干燥预冷温度 $-35^{\circ}C$, 最高升温 $30^{\circ}C$, 抽真空 20 小时, 瓶分装量按需设定, 但液体厚度不超过 1cm(参照专利 ZL2004100180513)。包被反应板上的硝基纤维膜的是针对另一反应决定簇的另一纯化 SAA 单抗或多抗, 浓度为 0.5mg/ml, 点样量 $2\mu l$ /点, 点样用的稀释 SAA 单抗稀释液是酸性缓冲液(柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液或醋酸缓冲液) pH3.0 ~ 6.5, 反应板是胶体金定量检测板(参照专利 ZL033435278)。

[0038] 2. 分别按比例配制样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液, 制备反应

板, 组装成品即得试剂盒。

[0039] 3. 使用方法:

[0040] (1) 从冷藏处取出抗 SAA 金标液冻干品, 室温至少平衡半小时, 在抗 SAA 金标液冻干品中, 准确加入标贴或说明书中规定体积的冻干品复溶液摇匀;

[0041] (2) 待测样品加入样品稀释液进行 40-480 倍稀释, 充分混匀;

[0042] (3) 将反应板平放于实验台上, 于反应孔内滴加 2 滴封闭液, 待完全渗入;

[0043] (4) 吸取稀释样品到反应板上, 待完全渗入后, 将步骤(1)得到的金标液加入到反应板孔中;

[0044] (5) 待完全渗入后, 加入 2 滴洗涤液;

[0045] (6) 待洗涤液完全渗入后, 于 5 分钟内在 Qpad 金标定量仪 SAA 项目下测度 SAA 值;

[0046] (7) Upper Opad 金标法定量读数仪按该仪器说明书操作。

[0047] 所制备的 SAA-SPOT 试剂盒在仁济医院与国际著名的进口 Siemens BN*II 系统(特种蛋白分析仪)及配套的 SIEMENS 血清淀粉样蛋白 A 测定试剂盒(散射比浊法)(批号 40025)做平行比较测定的结果如表 1 所示。

[0048]

标本编号	SAA-SPOT 测试值 mg/L	德灵试剂盒 mg/L	标本编号	SAA-SPOT 测试值 mg/L	德灵试剂盒 mg/L
1	<5	6.1	11	54.19	62.1
2	486.66	>248 (稀释后 543.7)	12	399.88	>248 (稀释后 368.1)
3	199.36	210.5	13	<5	3.7
4	99.70	97.4	14	126.37	150.4
5	<5	1.1	15	32.66	40.5
6	42.98	50.8	16	<5	5.7
7	356.95	>248 (稀释后 320.9)	17	20.00	18.5
8	12.00	12.1	18	289.77	>248 (稀释后 318.6)
9	14.50	13.1	19	88.69	100.8
10	<5	1.7	20	<5	2.2

[0049] Siemens 仪器和配套的血清淀粉样蛋白 A 测定试剂盒(散射比浊法)是高级的进口仪器和原装试剂盒, 价格昂贵, 一般只有大医院中心实验室才有配置, 其精度和结果公认可靠。由图 1 显示可知本发明的试剂盒测定结果与 Siemens 仪器及配套试剂盒测定的结果相关系数 R 为 0.989, 相关性很好。

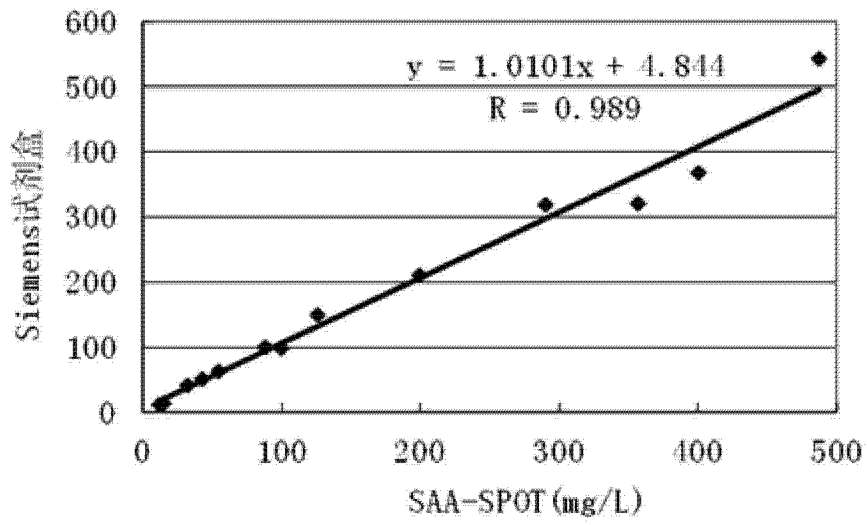


图 1

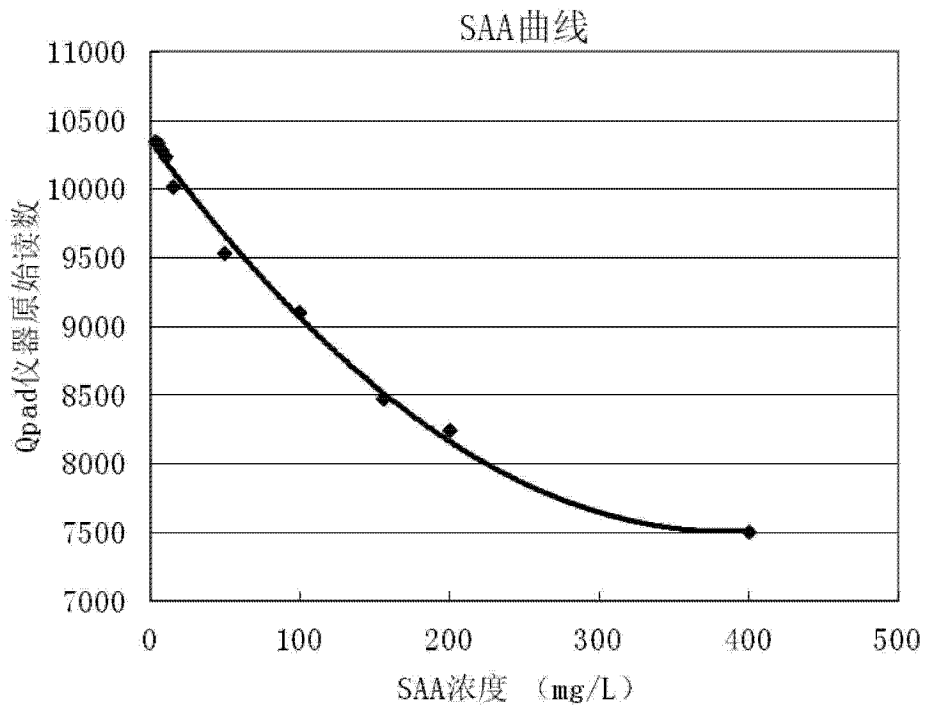


图 2

专利名称(译)	快速定量检测血清淀粉样蛋白A试剂盒及其制备和应用		
公开(公告)号	CN103076455B	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201210575603.5	申请日	2012-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
[标]发明人	杨晶 沈旭辉 翟小杰		
发明人	杨晶 沈旭辉 翟小杰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	黄志达		
其他公开文献	CN103076455A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫胶体金法快速定量检测血清淀粉样蛋白A试剂盒及其制备和应用，试剂盒包括冻干抗SAA免疫胶体金、反应板、样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液。制备方法包括：(1)首先制备胶体金和抗SAA免疫胶体金缀合物；制备冻干抗SAA免疫胶体金；(2)分别按比例配制样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液，制备反应板，组装成品即得试剂盒。本发明可以在人体发生疾病时医生当场可获知SAA测定结果，能快速判断病人病情，从而更有针对性的对病人进行有效处理，缩短治愈时间，降低医疗费用，具有良好的应用前景。

