



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107102133 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201611018793.5

(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
王国松

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(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

一种胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:纯化的胰岛细胞包被的磁微粒工作液、吖啶酯标记的抗人IgG工作液、胰岛细胞抗体定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种胰岛细胞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. 一种胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒, 所述试剂盒包括: 纯化的胰岛细胞包被的磁微粒工作液、吖啶酯标记的抗人IgG吖啶酯标记的纯化的胰岛细胞工作液、胰岛细胞抗体定标品、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, 所述胰岛细胞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, 所述胰岛细胞抗原包被的固相载体为羧基化的粒径为0.05-1 μ 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(H₂O₂)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, 所述胰岛细胞抗体定标品为用标准品缓冲液将胰岛细胞抗体配制浓度为5 U/mL、20 U/mL、40 U/mL、80 U/mL、150 U/mL、300 U/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, 其特征在于包括胰岛细胞包被的磁微粒的制备、胰岛细胞标记的吖啶酯的制备、化学发光底物液的制备、胰岛细胞抗体定标品的制备。

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) 胰岛细胞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, 加入胰岛细胞抗原, 室温下混悬2-10 h, 磁分离, 去除上清, Tris缓冲液重悬, 得到胰岛细胞抗原包被的磁微粒; 可选的, 羧基化纳米磁珠直径为0.1 μ m ~ 2.0 μ m;

MES缓冲液浓度为10mM ~ 100mM, pH 5.5 ~ 8.5;

2) 吖啶酯标记的鼠抗人IgG制备:

取鼠抗人IgG, 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, 1-2 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, 最后加入得到的吖啶酯标记的鼠抗人IgG溶液, 收集离心管中的液体至保存管得到胰岛细胞标记的吖啶酯;

3) 胰岛细胞抗体定标品的制备:

用标准品缓冲液将胰岛细胞抗体配置浓度为5 U/mL、20 U/mL、40U/mL、80 U/mL、150 U/mL、300 U/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 μ L质量分数为20%的双氧水(H₂O₂)、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。

一种胰岛细胞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,本发明提供了一种胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 胰岛细胞抗体(Islet cell antibody,ICA)是一种对胰岛细胞的胞浆成分起作用的特异性抗体,属IgG免疫球蛋白。血清中的ICA可与 β 细胞起反应而产生细胞毒作用。

[0003] 胰岛素依赖型糖尿病(Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)或称I型糖尿病是一种渐进的慢性损伤疾病,它能损害胰岛素的产生与分泌,以及改变血糖代谢机制。胰岛素是由胰岛细胞或者Langhans细胞合成并分泌的一种激素。而在IDDM患者中,其体内的自身抗体会引起胰岛细胞的免疫性损伤,从而破坏了胰岛素的正常合成功能,此类正常的自身免疫性疾病可由遗传以及有毒物质接触,病毒感染和各种精神压力所引发。

[0004] ICA是诊断胰岛素依赖性糖尿病的高敏感性、高特异性指标。正常人群抗ICA抗体的阳性率仅为0.5%,在I型糖尿病新发患者中阳性率高达60~90%,高滴度的抗ICA抗体预示疾病进展的高危险性。此外,血清检测ICA是IDDM早期诊断的重要手段,同时也为糖尿病的正确治疗,疗效观察及预后判断提供有价值的指标。 μ L临床检测胰岛细胞抗体的常见方法有放射性免疫法、酶联免疫吸附法,但这些方法都存在着一些不足之处。

[0005] 一、放射性免疫法

该方法的基本原理是先用放射性的 I^{125} 标记重组胰岛细胞抗原,血清中的特异性抗体先与抗原结合形成抗原抗体复合物,加入二抗后孵育形成抗原-抗体-二抗复合物,离心后检测放射性强弱从而判断血清中特异性抗体的含量。该方法技术较成熟,但是其不足也很明显:

- (1) 放射性对操作者身体有影响;
- (2) 操作相对较复杂,需要离心机和放射性检测装置,很多基层医院难以推广;
- (3) 本底高,特异性不好;

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 $\times$ 8型、6 $\times$ 8型、8 $\times$ 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

[0006] 目前胰岛细胞抗体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、操作复杂等。

[0007] 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、操作简单的胰岛细胞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:胰岛细胞抗原包被的磁微粒、吖啶酯标记的抗人IgG以及胰岛细胞抗体定标品;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;最后对胰岛细胞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。

[0008] 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0.06 U/mL,相比其它的胰岛细胞抗体检测方法灵敏度至少提高了15倍;

3、本发明选用的吖啶酯化学发光免疫分析系统线性范围宽,能达到5-300U/mL,其它的胰岛细胞抗体化学发光检测方法的检线性范围为10-200U/mL;

4、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;

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。

附图说明

[0009] 图1为实施例3得到的胰岛细胞抗体标准曲线图。

具体实施方式

[0010] 实施例1:胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒制备方法

(1) 胰岛细胞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 μ 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 胰岛细胞抗原,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,得到胰岛细胞抗原的磁微粒,每瓶5 mL分装保存于4℃备用。

[0011] (2) 吖啶酯标记的鼠抗人IgG的制备:

取50 μL 25mg/mL的鼠抗人IgG,加入150 μL 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 μL 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,最后加入得到的胰岛细胞标记的吡啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到胰岛细胞标记的吡啶酯,每瓶5 mL分装保存于4℃备用。

[0012] (3)胰岛细胞抗体定标品的制备:

用标准品缓冲液(40 mM Tris-HCl,0.5% BSA,1% NaCl,pH 8.0)将胰岛细胞抗体配置成浓度为5 U/mL、20 U/mL、80 U/mL、200 U/mL、800 U/mL、2000 U/mL,每瓶0.5 mL,分装冻干,4℃保存备用。

[0013] (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 μL 质量分数为20%的双氧水(H_2O_2)、1.0克叠氮化钠、1.5克吐温20,摇匀后避光存放。

[0014] (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 405,摇匀后避光存放。

[0015] 实施例2:胰岛细胞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间接法。先将血清/血浆样本1:50倍稀释,取稀释后的样本50 μL 、50 μL 的胰岛细胞包被的磁微粒微粒孵育10 min后,进行磁分离清洗,再加入100 μL 鼠抗人IgG(20ng/mL),孵育10min,然后进行磁分离清洗。仪器将磁分离后的反应混合物送入暗室,依次加入50 μL 化学发光预激发液、50 μL 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胰岛细胞抗体含量。

[0016] 实施例3:胰岛细胞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。

[0017] 分析灵敏度的检测:

参照CLSI EP17-A 文件推荐实验方案,计算胰岛细胞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0.06。

[0018] 线性的检测:

对浓度为5 U/mL、20 U/mL、40 U/mL、80 U/mL、150 U/mL、300 U/mL标准品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9786$,另外,该试剂盒对胰岛细胞抗体样品检测的线性范围为5-300 U/mL。

[0019] 精密度测定:

取浓度20 U/mL和150 U/mL为两个胰岛细胞抗体样品,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%。

[0020] 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

验室胰岛细胞抗体准确评估。

[0021] 实施例4:胰岛细胞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0.06 U/mL,相对于传统的酶联免疫吸附法分析灵敏度0.91 IU/mL,提高了约15倍。

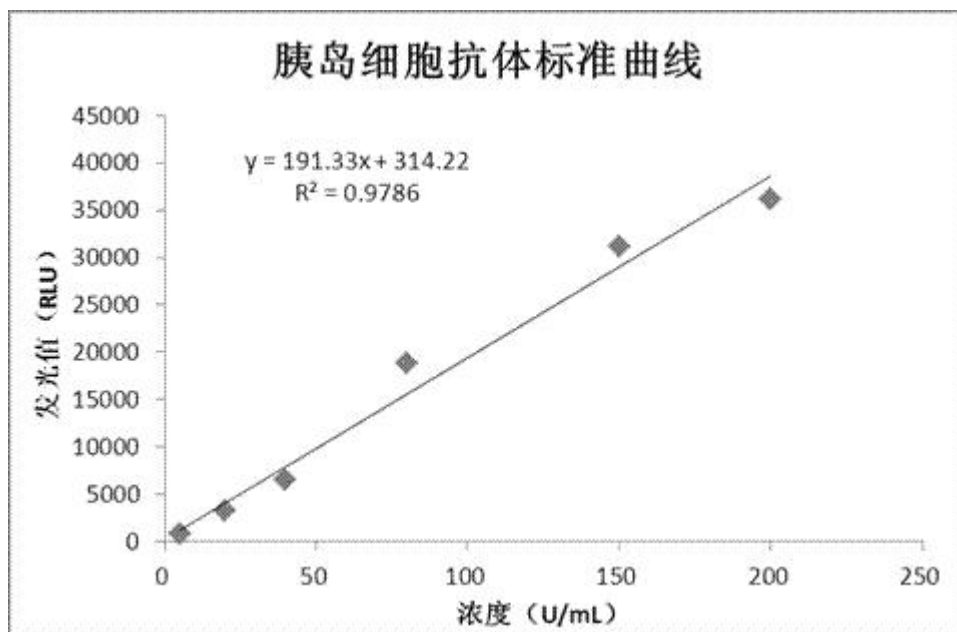


图1

专利名称(译)	一种胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107102133A	公开(公告)日	2017-08-29
申请号	CN201611018793.5	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 王国松		
发明人	陈巧红 杨永宏 王栋凯 刘星 王国松		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胰岛细胞抗体化学发光免疫检测试剂盒，所述试剂盒包括：纯化的胰岛细胞包被的磁微粒工作液、吖啶酯标记的抗人IgG工作液、胰岛细胞抗体定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种胰岛细胞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。

