



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107976535 B

(45)授权公告日 2020.03.20

(21)申请号 201711069928.5

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2017.11.03

审查员 刘莉丹

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107976535 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(73)专利权人 科美诊断技术股份有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤
中路7号北科现代制造园孵化楼一层、
六层

(72)发明人 赵文雅 刘宇卉 李临

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司

公司 11372

代理人 吴大建 桑胜梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒及其使用方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒及其使用方法和应用。该试剂盒包括试剂a,其包括已知抗原,所述已知抗原能够与待检样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物;试剂b,其包括补体C1q,所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物,且所述补体C1q不能与游离的IgM抗体结合;其中,所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体相连;所述受体能够与其接收到的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;试剂c,其包括供体,所述供体能够在激发状态生成单线态氧。利用上述该试剂盒检测样本中目标IgM抗体的方法解决了非特异性IgM抗体对检测的影响。

1. 一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒,其包括:
试剂a,其包括已知抗原,所述已知抗原能够与待检样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物;
试剂b,其包括补体C1q,所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物,且所述补体C1q不与游离的IgM抗体结合;
其中,所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体相连;所述受体能够与其接收到的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;
试剂c,其包括供体,所述供体能够在激发状态生成单线态氧;
所述试剂盒中还包括封闭剂,所述封闭剂能阻断所述已知抗原与样本中的IgG抗体相结合。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂b中的补体C1q与受体连接。
3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述封闭剂由多克隆抗体和/或抗体片段组成。
4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述封闭剂由单价抗体片段组成。
5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述封闭剂的摩尔量大于样本中IgG抗体的摩尔量。
6. 一种利用如权利要求1-5中任一项所述试剂盒检测样本中目标IgM抗体的方法,其包括以下步骤:首先制备由C1q-供体-IgM抗体-已知抗原-受体形成的复合物;然后利用能量或者活性化合物处理上述复合物,激发供体产生单线态氧,受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;最后分析所述化学发光信号情况,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法具体包括以下步骤:
S1,将试剂a和试剂b加入到待测样本中,得到第一混合物;
S2,将试剂c加入到第一混合物中,得到第二混合物;
S3,用能量或者活性化合物处理第二混合物,激发供体产生单线态氧,受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;
S4,分析所述化学发光信号情况,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤S1中,将试剂a先加入待测样本中,然后再加入试剂b。
9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤S1中,将试剂a和试剂b同时加入到待测样本中。
10. 根据权利要求7-9中任一项所述的方法,其特征在于,步骤S1之前还包括步骤S0,其将待测样本加入到含IgG抗体封闭剂的溶液中进行封闭,获得封闭后的待测样本。
11. 根据权利要求7-9中任一项所述的方法,其特征在于,当第二混合物的化学发光信号值 \geq 定性参考品的化学发光信号值时,则待测样本为阳性样本;当第二混合物的化学发光信号值 $<$ 定性参考品的化学物发光信号值时,则待测样本为阴性样本。
12. 根据权利要求6-9中任一项所述的方法,其特征在于,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物。

13. 根据权利要求6-9中任一项所述的方法,其特征在於,所用试剂均为非粒子化试剂,且可溶于含水介质中。

14. 一种如权利要求1-5中任一项所述的试剂盒或权利要求6-13中任一项所述的方法在检测病毒的IgM抗体中的应用。

一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒及其使用方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测技术领域,具体涉及一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒及其使用方法和应用。

背景技术

[0002] IgM类抗体的检测在医学检验中具有重要的意义。病原体初次感染机体,最先产生的抗体总是IgM抗体,随着机体免疫应答的进程,发生抗体类别转换,产生IgG、IgM或IgA抗体。因而,在感染性疾病的诊断中,IgM抗体检测呈阳性是现症感染的标志。

[0003] 目前常用的IgM抗体检测的方法有捕获法,其是在固相载体上固相包被抗人IgM(μ 链)抗体,血清/血浆样本经过与固相载体反应后,样本中的所有IgM抗体被捕获到固相载体上,此时经过洗涤,可以去除特异性IgG抗体的干扰,加入标记的抗原,经反应产生可以检测的信号。该方法存在以下两个弊端:一是抗人IgM抗体作为捕获抗体,无法区分特异性IgM抗体和非特异性IgM抗体,当特异性IgM抗体浓度较低而非特异性IgM抗体浓度特别高时,可能会存在特异性IgM抗体被洗涤而除去,造成假阴性的结果。二是检测过程需经过两步孵育和洗涤,在洗涤的过程中非常依赖洗涤设备的洗涤效率,容易出现重复性差等问题,两次孵育步骤繁琐,耗时长,降低了工作效率。

[0004] 另外一种IgM抗体的检测方法使用均相的一步法检测,在检测过程中加入去除特异性IgG干扰的生物活性物质,解决了捕获法需要两步洗涤效率低,耗时长的问题。但是该方法加入了一种新的生物活性物质,反应系统中存在过多的蛋白组分,有造成假阳性的可能。另外,均相反应系统中非特异性IgM抗体也会消耗大量的抗人IgM抗体,当特异性IgM抗体浓度较低而非特异性IgM抗体浓度特别高时,也有造成假阴性的可能。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足提供了一种检测样本中目标IgM抗体的试剂盒和方法。利用该试剂盒中含有的补体C1q代替抗人IgM抗体作为捕获物或示踪物,进而检测目标IgM抗体的方法,由于非特异性IgM抗体不与已知抗原发生反应,呈游离状态,因而不能与补体C1q结合,去除了非特异性IgM对检测的干扰。

[0006] 为此,本发明第一方面提供了一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒,其包括:

[0007] 试剂a,其包括已知抗原,所述已知抗原能够与待检样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物;

[0008] 试剂b,其包括补体C1q,所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物,且所述补体C1q不能与游离的IgM抗体结合;

[0009] 其中,所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体相连;所述受体能够与其接收到的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;

[0010] 试剂c,其包括供体,所述供体能够在激发状态生成单线态氧。

[0011] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒包括:

[0012] 试剂a,其包括已知抗原,所述已知抗原能够与待测样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物;

[0013] 试剂b,其包括补体C1q,所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物,且所述补体C1q不能与游离的IgM抗体结合;

[0014] 其中,所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体微球相连,而另一种则与第一标记物相连;所述受体微球能够与其接收到的单线态氧反应生成检测信号;

[0015] 试剂c,其包括与第二标记物结合的供体微球,所述供体微球能在激发状态生成单线态氧;所述第二标记物能与所述第一标记物特异性结合。

[0016] 在本发明的一些实施方式,所述试剂a中的已知抗原与第一标记物相连,而所述试剂b中的补体C1q则与受体微球相连。在一些具体的实施例中,所述试剂a中与第一标记物相连的已知抗原的浓度为1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,所述试剂b中与受体微球相连的补体C1q的浓度为0.1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0017] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂a中的已知抗原与受体微球相连,而所述试剂b中的补体C1q与第一标记物相连。在一些具体的实施例中,所述试剂a中与受体微球相连的已知抗原的浓度0.1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,所述试剂b种与第一标记物相连的补体C1q的浓度为1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂c中与第二标记物结合的供体微球的浓度为1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0019] 根据本发明,所述第一标记物可以为生物素,所述第二标记物可以为链霉亲和素。所述“生物素”广泛存在于动植物组织中,其分子上有两个环状结构,分别为咪唑酮环和噻吩环,其中咪唑酮环是与链霉亲和素结合的主要部位。活化的生物素可以在蛋白质交联剂的介导下,与已知的几乎所有生物大分子偶联,包括蛋白质、核酸、多糖和脂类等。“链霉亲和素”是由链霉菌分泌的一种蛋白质,分子量为65kD。链霉亲和素分子由4条相同的肽链组成,其中每条肽链都能结合一个生物素。因此每个抗原或抗体可同时偶联多个生物素分子,从而产生“触手效应”提高分析灵敏度。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒中还包括封闭剂,所述封闭剂能阻断所述已知抗原与样本中的IgG抗体相结合。

[0021] 根据本发明,所述封闭剂由多克隆抗体和/或抗体片段组成,优选由单价抗体片段组成,例如Fab片段,其可通过用木瓜蛋白酶酶切割抗体并随后分解裂解产物而获得。

[0022] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述封闭剂的摩尔量大于样本中IgG抗体的摩尔量;优选地,所述封闭剂的摩尔量为样本中IgG抗体摩尔量的5倍以上。

[0023] 本发明第二方面提供了一种利用本发明第一方面所述试剂盒检测样本中目标IgM抗体的方法,其包括以下步骤:首先制备由C1q-供体-IgM抗体-已知抗原-受体形成的复合物;然后利用能量或者活性化合物处理上述复合物,激发供体产生单线态氧,受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;最后分析所述化学发光信号,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量或浓度。

[0024] 在本发明的一些实施方式中,所述方法具体包括如下步骤:

- [0025] S1,将试剂a和试剂b加入到待测样本中,得到第一混合物;
- [0026] S2,将试剂c加入到第一混合物中,得到第二混合物;
- [0027] S3,用能量或者活性化合物处理第二混合物,激发其中所述供体形成单线态氧,所述受体与其接收到的单线态氧反应生成检测信号;
- [0028] S4,分析所述化学发光信号,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量。
- [0029] 在本发明的一些实施方式中,步骤S1中,将试剂a先加入待测样本中,然后再加入试剂b。
- [0030] 在本发明的另一些实施方式中,步骤S1中,将试剂a和试剂b同时加入到待测样本中。
- [0031] 根据本发明,步骤S1之前还包括步骤S0,将待测样本加入到含IgG抗体封闭剂的溶液中进行封闭,获得封闭后的待测样本。所述封闭后的待测样本中的IgG抗体不能与已知抗原形成抗原-IgG抗体复合物。
- [0032] 根据本发明,当第二混合物的化学发光信号值 \geq 定性参考品的化学发光信号值时,则待测样本为阳性样本;当第二混合物的化学发光信号值 $<$ 定性参考品的化学物发光信号值时,则待测样本为阴性样本。
- [0033] 本发明中,用语“定性参考品的化学发光信号值”为标定好的目标IgM抗体临界值在相同条件下进行检测时的化学发光信号值。
- [0034] 本发明第三方面提供了一种如本发明第一方面所述的试剂盒或本发明第二方面所述的方法在检测肝炎病毒的IgM抗体中的应用。
- [0035] 本发明的有益效果为:利用本发明所述试剂盒含有的补体C1q作为捕获物或者示踪物用于目标IgM抗体的检测。利用补体C1q不与游离抗原和游离抗体发生反应,只与IgM抗体及某些亚类的IgG抗体形成的抗原-抗体复合物发生反应的特性,在反应系统中加入IgG抗体封闭剂,阻断抗原-IgG抗体复合物的形成,进而能够有效检测出目标IgM抗体的存在,同时有效去除非特异性IgM抗体对检测的干扰,解决了传统IgM抗体检测时非特异性IgM抗体对检测的影响。

具体实施方式

- [0036] 为使本发明容易理解,下面将详细说明本发明。
- [0037] 如前所述,现有的检测IgM抗体的技术都是通过抗人IgM抗体与IgM抗体的结合来实现的。抗人IgM抗体作为捕获抗体,无法区分特异性IgM抗体(目标IgM抗体)和非特异性IgM抗体,当目标IgM抗体浓度较低而非特异性IgM抗体浓度特别高时,会造成假阴性的结果。本申请的发明人利用补体C1q只能与抗原-抗体复合物发生反应的特性,将补体C1q作为捕获物或者示踪物,能够有效去除非特异性IgM抗体对检测的干扰,对目标IgM抗体进行有效检测。
- [0038] 因此,本发明第一方面所涉及的检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒,其包括:
- [0039] 试剂a,其包括已知抗原,所述已知抗原能够与待检样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物;

[0040] 试剂b,其包括补体C1q,所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物,且所述补体C1q不能与游离的IgM抗体结合;

[0041] 其中,所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体相连;所述受体能够与其接收到的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;

[0042] 试剂c,其包括供体,所述供体能够在激发状态生成单线态氧。

[0043] 本发明所述“补体C1q”是构成补体C1的一个重要成分,由6个相同的亚单位组成对称的六聚体。补体C1q只与IgM抗体及IgG1、IgG2、IgG3抗体形成的抗原-抗体复合物结合。由于非特异性IgM抗体不能与已知抗原发生反应产生抗原-抗体复合物,因此补体C1q不与非特异性IgM抗体结合(C1q只结合与抗原结合的IgM,而不结合游离的IgM(未结合抗原的),且IgG的结合能力弱于IgM,存在显著差别)。若在待测样本中加入IgG抗体的封闭剂,阻断抗原-IgG抗体复合物的形成,此时只有抗原-目标IgM抗体复合物与补体C1q发生反应。将已知抗原和补体C1q中的一种与受体相连,另一种与生物素相连,C1q-目标IgM抗体-抗原复合物与加入的链霉亲和素结合的供体结合后,拉近受体和供体之间的距离。通过光激发,受体会与就近供体散发的单线态氧反应,产生的能量以光的形式发射出去,产生化学发光信号值。

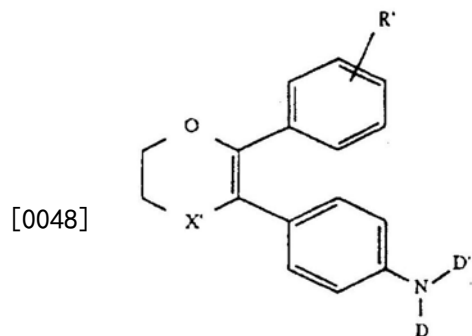
[0044] 本发明所述“供体”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体可以是光活化的(如染料和芳香化合物)或者化学活化的(如酶、金属盐等)。在本发明一些具体实施例中,所述供体是光敏剂,所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂,优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物,其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994(该专利文献在此全文引为参考)公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物,以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物,所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对成员的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用,例如美国专利US6406913中记载的内容,该专利文献并入本文以供参考。在本发明另一些具体实施例中,所述供体是化学活化的其他敏化剂,其非限定性的例子是某些化合物,它们催化过氧化氢转化为单线态氧和水。其他一些供体的例子包括:1,4-二羧基乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物等,加热这些化合物或者这些化合物直接吸收光会释放单线态氧。

[0045] 本发明所述“受体”是指能够与单线态氧反应可以产生可检测信号的化合物。供体被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的单线态氧,该高能态的单线态氧被近距离的受体俘获,从而传递能量以激活所述受体。在本发明的一些具体实施例中,所述受体是这样的物质,其经历与单线态氧的化学反应以形成不稳定的亚稳态中间体,所述亚稳态中间体可以分解,同时或随后发光。这些物质的典型例子包括但不限于:烯醇醚、烯胺、9-烷叉黄原胶、9-烷叉-N-烷基吡啶满、芳乙烯醚、双环氧乙烯、二甲基噻吩、芳香性咪唑或光泽精。在本发明的另一些具体实施例中,所述受体是能够与单线态氧反应以形成可以分解成酮类或羧酸衍生物的氢过氧化物或二氧环丁烷的烯炔类;可以通过光的作用分解的稳定二氧环丁烷;可以与单线态氧反应以形成二酮类的乙炔类;可以形成偶氮化合物或偶氮羰基化合物的腈类或酰肼类,诸如鲁米诺;和可以形成内过氧化物类的芳族化合物。可以根据本公开和要求保护的发明利用的受体的具体的、非限制性实例记载于美国专利号US5340716(该专利文献在此全文引为参考)。在本发明另一些具体实施例中,所述受体包含烯炔化合物和金属

螯合物,其是非粒子化的并且在含水介质中可溶,这种受体的情况可参见专利PCT/US2010/025433 (该专利文献在此全文引为参考)

[0046] 在本发明的一些优选实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物。

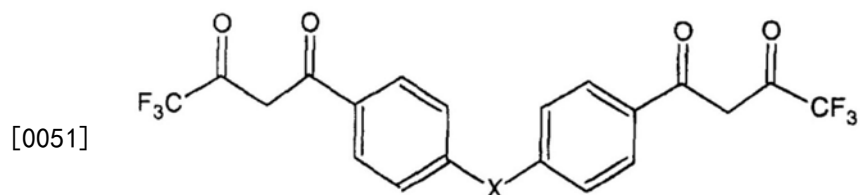
[0047] 在本发明的一些优选的实施例中,所述烯烃化合物如式 (I) 所示:



式 (I)

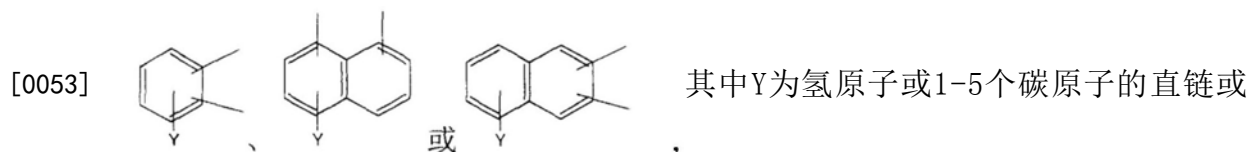
[0049] 其中,X'为硫原子或NR,所述R为具有1-10个碳原子的烷基或者6-18个碳原子的芳基;R'为氢原子或具有1-10个碳原子的烷基;D和D'各自独立为氢原子或具有1-20个碳原子的烷基。

[0050] 在本发明的另一些优选的实施例中,所述金属螯合物选自铈、铽、镝、钆、铕或钇的螯合物;优选地,所述金属螯合物选自铈的螯合物;进一步优选地,所述金属螯合物选自带有如式 (II) 所示双丁二酮化合物作为配位体的铈的螯合物;



式 (II)

[0052] 其中:X为具有1-5个碳原子的直链亚烷基;或者为亚芳基,所述亚芳基为



[0054] 在本发明中,所述“供体”和/或“受体”可以通过功能基团被包被在基体上形成“供体微球”和/或“受体微球”。本发明所述“基体”是本领域技术人员所公知的微球或微粒,其可以是任何尺寸的,有机的或是无机的,可膨胀或不可膨胀的,多孔的或非多孔的,具有任何密度,但优选具有和水接近的密度,优选能漂浮于水中,且由透明、部分透明或不透明的材料构成。所述基体可以有或没有电荷,当带有电荷时,优选是负电荷。所述基体可以是固体(如聚合物、金属、玻璃、有机物和无机物诸如矿物、盐和硅藻)、小油滴(如碳氢化合物、碳氟化合物、硅质流体)、囊泡(如合成的诸如磷脂、或天然的诸如细胞及细胞器官)。基体可以是乳胶颗粒或是含有有机或无机聚合物的其他颗粒、脂双层如脂质体、磷脂囊泡、小油滴、

硅颗粒、金属溶胶、细胞和微晶染料。基体通常具有多功能性,或者能够通过特异或非特异的共价或非共价相互作用而结合到供体或受体上。有许多官能团是可用的或者将其合并进来。典型的官能团包括羧酸、乙醛、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基等。适用于本发明的基体的一个非限制性的例子是羧基改性的乳胶颗粒。这种基体的详细情况可参见美国专利US5709994与US5780646(这两篇专利文献在此全文引为参考)。

[0055] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒具体包括:

[0056] 试剂a,其包括已知抗原,所述已知抗原能够与待测样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物;

[0057] 试剂b,其包括补体C1q,所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物,且所述补体C1q不能与游离的IgM抗体结合;

[0058] 其中,所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体微球相连,而另一种则与第一标记物相连;所述受体微球能够与其接收到的单线态氧反应生成检测信号;

[0059] 试剂c,其包括与第二标记物结合的供体微球,所述供体微球能在激发状态生成单线态氧;所述第二标记物能与所述第一标记物特异性结合。

[0060] 在本发明的一些实施方式中,所述第一标记物为生物素,而第二标记物为链霉亲和素。

[0061] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒中还包括封闭剂,其能阻断所述已知抗原与样本中的IgG抗体相结合。所述封闭剂由多克隆抗体或/和抗体片段组成,优选由单价抗体片段组成,例如Fab片段,其可通过用木瓜蛋白酶酶切割抗体并随后分解裂解产物而获得。进一步优选地,使用的所述封闭剂的摩尔量为待封闭IgG抗体摩尔量的5倍以上。

[0062] 本发明第二方面所涉及一种利用本发明第一方面所述试剂盒检测样本中目标IgM抗体的方法(非疾病诊断目的),其包括以下步骤:首先制备由C1q-供体-IgM抗体-已知抗原-受体形成的复合物;然后利用能量或者活性化合物处理上述复合物,激发供体产生单线态氧,受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;最后分析所述化学发光信号,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量或浓度。

[0063] 在本发明的一些实施方式中,所述方法包括如下步骤:

[0064] S0,将待测样本加入到含IgG抗体封闭剂的溶液中,于35-40°C下孵育5-10min进行封闭,阻断抗原-IgG抗体复合物的形成,获得封闭后的待测样本。

[0065] S1,将试剂a加入到待测样本中,于35-40°C下孵育5-10min后再加入试剂b,于35-40°C下继续孵育5-10min后,获得第一混合物。所述试剂a中的已知抗原与第一标记物相连,而所述试剂b中的补体C1q则与受体微球相连。具体地,所述试剂a中与第一标记物相连的已知抗原的浓度为1-100 μ g/ml,所述试剂b中与受体微球相连的补体C1q的浓度为0.1-10 μ g/ml。或者所述试剂a中的已知抗原与受体微球相连,而所述试剂b中的补体C1q与第一标记物相连。具体地,所述试剂a中与受体微球相连的已知抗原的浓度0.1-10 μ g/ml,所述试剂b中与第一标记物相连的补体C1q的浓度为1-100 μ g/ml。

[0066] S2,将试剂c加入到第一混合物中,于35-40°C下孵育5-10min后,获得第二混合物。所述试剂c中与第二标记物结合的供体微球的浓度为1-100 μ g/ml。

[0067] S3,用能量或者活性化合物处理第二混合物,激发供体微球产生单线态氧,受体微球与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;

[0068] S4,分析所述化学发光信号,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量。若第二混合物的信号值 \geq 定性参考品的信号值时,则待测样本为阳性样本;若第二混合物的信号值 $<$ 定性参考品的信号值时,则待测样本为阴性样本。

[0069] 在本发明的另一些实施方式中,所述方法包括如下步骤:

[0070] S0,将待测样本加入到含IgG抗体封闭剂的溶液中,于35-40 $^{\circ}$ C下孵育5-10min进行封闭,阻断抗原-IgG抗体复合物的形成,获得封闭后的待测样本。

[0071] S1,将试剂a和第二混合物同时加入到待测样本中,于35-40 $^{\circ}$ C下孵育5-10min后获得第一混合物。所述试剂a中的已知抗原与第一标记物相连,而所述试剂b中的补体C1q则与受体微球相连。具体地,所述试剂a中与第一标记物相连的已知抗原的浓度为1-100 μ g/ml,所述试剂b中与受体微球相连的补体C1q的浓度为0.1-10 μ g/ml。或者所述试剂a中的已知抗原与受体微球相连,而所述试剂b中的补体C1q与第一标记物相连。具体地,所述试剂a中与受体微球相连的已知抗原的浓度0.1-10 μ g/ml,所述试剂b种与第一标记物相连的补体C1q的浓度为1-100 μ g/ml。

[0072] S2,将试剂c加入到第一混合物中,于35-40 $^{\circ}$ C下孵育5-10min后,获得第二混合物。所述试剂c中与第二标记物结合的供体微球的浓度为1-100 μ g/ml。

[0073] S3,用能量或者活性化合物处理第二混合物,激发供体微球产生单线态氧,受体微球与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;

[0074] S4,分析所述化学发光信号,判断待测样本中是否存在目标IgM抗体以及目标IgM抗体的含量。若第二混合物的信号值 \geq 定性参考品的信号值时,则待测样本为阳性样本;若第二混合物的信号值 $<$ 定性参考品的信号值时,则待测样本为阴性样本。

[0075] 本发明第三方面涉及一种如本发明第一方面所述的试剂盒或本发明第二方面所述的方法在检测肝炎病毒的IgM抗体中的应用。

[0076] 实施例

[0077] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0078] 实施例1:HBc IgM抗体的检测

[0079] 所采用的试剂包括:

[0080] R1:浓度为25 μ g/ml的与受体微球相连的补体C1q溶液;

[0081] R2:浓度为1 μ g/ml的与生物素相连的HBcAg溶液;

[0082] R3:含IgG抗体封闭剂的稀释液;

[0083] R4:浓度为25 μ g/ml的与链霉亲和素(SA)相连的供体微球溶液。

[0084] 其中用作本发明的受体微球的制备方法、组成结构及其含量可以参见中国专利CN100429197C的实施例1,然后将C1q补体包被在受体微球的表面。

[0085] 供体微球是按照专利US5780646的实施例所述的方法将200 μ g叶绿素A放入200nm的羧基改性的乳胶颗粒中,并将链霉亲和素包被在表面以形成本发明所述的供体微球。

[0086] 检测步骤为:

[0087] (1)在反应孔中加入100 μ l试剂R3,然后加入10 μ l待测样本,于37 $^{\circ}$ C下孵育5min;

[0088] (2)在反应孔中加入试剂R1和试剂R2各25 μ l,于37 $^{\circ}$ C下孵育10min,获得第一混合

物；

[0089] (3) 在反应孔中加入25ul试剂R4,于37℃下孵育10min,获得第二混合物；

[0090] (4) 将第二混合物放入到光激化学发光检测仪器,读取化学发光信号值,结果如表1所示。

[0091] 表1:各样本所读取的化学发光信号值。

阳性样本	化学发光信号值	阴性样本	化学发光信号值
P1	10794	N1	456
P2	32068	N2	394
P3	11965	N3	155
P4	37559	N4	236

[0093] 实施例2:HEV IgM抗体的检测

[0094] 所采用的试剂包括:

[0095] R1:浓度为25ug/ml的与受体微球相连的HEV Ag溶液；

[0096] R2:浓度为1ug/ml的与生物素相连的补体C1q溶液；

[0097] R3:含IgG抗体封闭剂的稀释液；

[0098] R4:浓度为25ug/ml的与链霉亲和素相连的供体微球溶液。

[0099] 检测步骤为:

[0100] (1) 在反应孔中加入100ul试剂R3,然后加入10ul待测样本,于37℃下孵育5min；

[0101] (2) 在反应孔中加入试剂R1和试剂R2各25ul,于37℃下孵育10min,获得第一混合物；

[0102] (3) 在反应孔中加入25ul试剂R4,于37℃下孵育10min,获得第二混合物；

[0103] (4) 将第二混合物放入到光激化学发光检测仪器,读取化学发光信号值,结果如表2所示。

[0104] 表2:各样本所读取的化学发光信号值。

阳性样本	化学发光信号值	阴性样本	化学发光信号值
P1	20590	N1	779
P2	16542	N2	570
P3	7394	N3	515
P4	17434	N4	549

[0106] 实施例3:HBc IgM抗体的检测

[0107] 所采用的试剂包括:

[0108] R1:浓度为25ug/ml的与受体相连的补体C1q溶液；

[0109] R2:浓度为1ug/ml的与生物素相连的HBcAg溶液；

[0110] R3:含IgG抗体封闭剂的稀释液；

[0111] R4:浓度为25ug/ml的与链霉亲和素(SA)相连的供体溶液。

[0112] 其中用作本发明的与受体相连的补体C1q是按照专利PCT/US2010/025433中记载的方案来制备的,其结构是由C1q-BSA-(二甲基噻吩)(BHHCT)构成,在水溶液中能够完全溶解。

[0113] 供体是按照专利US5780646的实施例所述的方法将200g叶绿素A放入200nm的羧基改性的乳胶颗粒中,并将链霉亲和素包被在表面以形成本发明所述的供体微球。

[0114] 检测步骤为:

[0115] (1) 在反应孔中加入100ul试剂R3,然后加入10ul待测样本,于37℃下孵育5min;

[0116] (2) 在反应孔中加入试剂R1和试剂R2各25ul,于37℃下孵育10min,获得第一混合物;

[0117] (3) 在反应孔中加入25ul试剂R4,于37℃下孵育10min,获得第二混合物;

[0118] (4) 将第二混合物放入到光激化学发光检测仪器中,读取化学发光信号值,结果如表3所示。

[0119] 表3:各样本所读取的化学发光信号值。

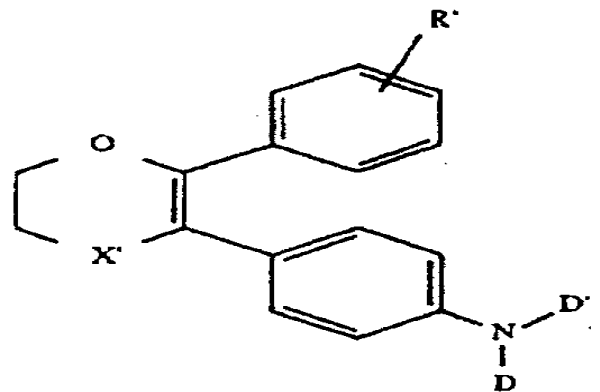
	阳性样本	化学发光信号值	阴性样本	化学发光信号值
[0120]	P1	30766	N1	325
	P2	20281	N2	146
	P3	16889	N3	231
	P4	18550	N4	368

[0121] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

专利名称(译)	一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒及其使用方法和应用		
公开(公告)号	CN107976535B	公开(公告)日	2020-03-20
申请号	CN2017111069928.5	申请日	2017-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	赵文雅 刘宇卉 李临		
发明人	赵文雅 刘宇卉 李临		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/6854		
其他公开文献	CN107976535A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测样本中目标IgM抗体的均相免疫检测试剂盒及其使用方法和应用。该试剂盒包括试剂a，其包括已知抗原，所述已知抗原能够与待检样本中的目标IgM抗体特异性结合形成第一复合物；试剂b，其包括补体C1q，所述补体C1q能够与所述第一复合物特异性结合形成第二复合物，且所述补体C1q不能与游离的IgM抗体结合；其中，所述已知抗原和补体C1q中的任一种与受体相连；所述受体能够与其接收到的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号；试剂c，其包括供体，所述供体能够在激发状态生成单线态氧。利用上述该试剂盒检测样本中目标IgM抗体的方法解决了非特异性IgM抗体对检测的影响。



式 (I)