



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105445456 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510785574. 9

(22) 申请日 2015. 11. 16

(71) 申请人 北京中航赛维生物科技有限公司
地址 101111 北京市经济技术开发区经海二
路 29 号院 8 号楼

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京中海智圣知识产权代理
有限公司 11282

代理人 胡静

(51) Int. Cl.

G01N 33/564(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

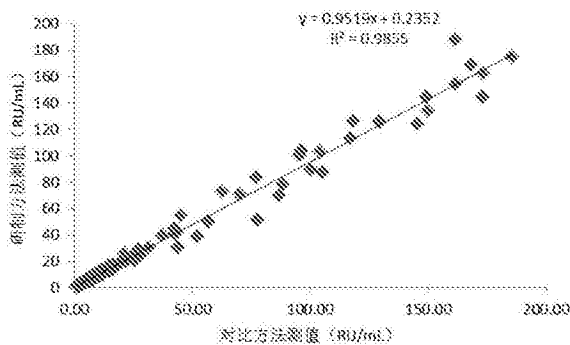
权利要求书3页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

一种使用磁微粒化学发光定量检测抗 SS-A 抗体 IgG 的试剂盒及其制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫学检测技术领域,具体涉及一种使用磁微粒化学发光定量检测抗 SS-A 抗体 IgG 的试剂盒及其制备方法和检测方法。本发明提供的一种使用磁微粒化学发光定量检测抗 SS-A 抗体 IgG 的试剂盒,包括 Anti-SS-A IgG 校准品、Anti-SS-A IgG 试剂 1 号、Anti-SS-A IgG 试剂 2 号、Anti-SS-A IgG 磁分离试剂、Anti-SS-A IgG 质控品和清洗液。本发明还公开了上述试剂盒的制备和检测方法。该检测方法在传统的膜条免疫法和酶联免疫吸附法的基础上,将灵敏度和线性范围再提高 3-5 个数量级、实现了定量检测,具有敏感度高、特异性强、准确性好、成本低、操作简便和结果判断客观优点,并配合全自动化学发光免疫分析仪实现全自动使用,具有广阔的应用前景。



1. 一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒,所述试剂盒包括:Anti-SS-A IgG校准品、Anti-SS-A IgG试剂1号、Anti-SS-A IgG试剂2号、Anti-SS-A IgG磁分离试剂、Anti-SS-A IgG质控品和清洗液,其特征在于:

所述Anti-SS-A IgG校准品包括6个液体校准瓶,所述液体校准瓶内目标浓度分别为0、5、20、50、100、200RU/mL的Anti-SS-A IgG和牛血清白蛋白的Tris缓冲液;

所述Anti-SS-A IgG试剂1号为1个含有生物素标记的SS-A抗原和牛血清白蛋白的Tris缓冲液的瓶;

所述Anti-SS-A IgG试剂2号为1个含有碱性磷酸酶标记的羊抗人多克隆抗体和牛血清白蛋白的Tris缓冲液的瓶;

所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂为1个含有链霉亲和素标记的磁微粒和牛血清白蛋白的Tris缓冲液瓶;

所述Anti-SS-A IgG质控品包括2个质控瓶,所述质控瓶内的浓度的范围分别为:16-24RU/mL和80-120RU/mL。

2. 一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括:

步骤1. 制备所述Anti-SS-A IgG校准品包括:Anti-SS-A IgG校准品稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG校准品配制步骤:

所述Anti-SS-A IgG校准品稀释液的配制步骤包括:

加800mL纯化水和11.2g的Tris到容器中,搅拌混合均匀,再加8.5g的氯化钠和2mL的Proclin300,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.0-7.5,加40g的牛血清白蛋白到容器中,搅拌至完全溶解,再将pH值调为7.0-7.5,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述校准品稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

所述Anti-SS-A IgG校准品的配制步骤包括:

用上述Anti-SS-A IgG校准品稀释液将抗SS-A抗体IgG分别配制为0、5、20、50、100、200RU/mL共6个浓度点;

步骤2. 制备所述Anti-SS-A IgG试剂1号包括:Anti-SS-A IgG试剂1号稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG试剂1号配制步骤:

所述Anti-SS-A IgG试剂1号稀释液的配制步骤:

加800mL纯化水、12.1g的Tris和5.8g的NaCl于1L容器中,搅拌至完全溶解,再加入2mL的Proclin300,搅拌至完全溶解,再加入5g的牛血清白蛋白,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.0-7.5,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述试剂1号稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

所述Anti-SS-A IgG试剂1号的配制步骤:

用0.2mol/L的pH9.0碳酸盐缓冲液配制0.5mg/mL的生物素溶液,按照SS-A抗原与生物素溶液质量比为10:1的比例在SS-A抗原溶液中加入到上述0.5mg/mL的生物素溶液,混合均匀,室温静置18h,反应生成SS-A抗原-生物素连接物的反应液,将得到的SS-A抗原-生物素连接物反应液通过G-25凝胶柱进行分离,除去未反应的生物素,得到SS-A抗原-生物素连接物,再用所述试剂1号稀释液将SS-A抗原-生物素连接物稀释到0.1-0.3 μ g/mL,得到所述的试剂1号;

步骤3.制备所述Anti-SS-A IgG试剂2号包括:Anti-SS-A IgG试剂2号稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG试剂2号的配制步骤:

所述Anti-SS-A IgG试剂2号稀释液的配制步骤:

加800mL纯化水、6.06g的4-羟乙基哌嗪乙磺和8.5g的NaCl到容器中,搅拌至完全溶解,再加入5g的牛血清白蛋白、0.1g的ZnCl₂、0.2mL的Proclin 300和0.1g的MgCl₂,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.5-8.0,用纯化水定容至1L,使用0.2μm过滤器过滤,将获得的所述试剂2号稀释液保存在2-8℃待用;

所述Anti-SS-A IgG试剂2号的配制步骤:

将1mg的羊抗人抗体和2-4μL的10mg/mL的偶联剂为2-亚胺四氢噻吩溶液,室温静置20min,加入0.1mol/L的甘氨酸溶液10μL,室温静置5min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后抗体,将活化后的抗体保存在2-8℃备用,取1.5mg的碱性磷酸酶,加入5mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液10-20μL,室温静置30min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,将活化后的碱性磷酸酶保存在2-8℃备用,再将上述活化的羊抗人抗体与活化的碱性磷酸酶混合,在2-8℃条件下静置12-24h,用Superdex200凝胶纯化柱纯化,获得羊抗人抗体-碱性磷酸酶连接物浓溶液,置于2-8℃保存备用,将羊抗人抗体-碱性磷酸酶连接物浓溶液用所述试剂2号稀释液稀释到0.02-0.1μg/mL,得到所述的试剂2号;

步骤4.制备所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂包括:Anti-SS-A IgG磁分离试剂稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG磁分离试剂配制步骤:

所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂稀释液配制步骤:

加800mL纯化水、12.1g的Tris和8.5g的NaCl到容器中,搅拌至完全溶解,再加5g的牛血清白蛋白、50mL的新生牛血清和0.2mL的Proclin300,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.9-8.1,用纯化水定容至1L,使用0.2μm过滤器过滤,将获得的所述磁分离试剂稀释液保存在2-8℃待用;

所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂配制步骤:

取100mg磁微粒,磁分离去上清,取用0.025mol/L的pH值为4.5-6的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,室温下混匀2~3h,加入0.5-1.0mL新配制的浓度为10mg/mL的碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的2-吗啉乙磺酸缓冲液,室温振荡混悬30-60min,使磁珠充分活化,磁分离,去上清,用0.025mol/L的pH值为4.5-6的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,加入4-8mg的链霉亲和素,室温混悬16-20h,再进行磁分离,去上清,用百分比浓度0.5%的牛血清白蛋白,百分比浓度0.5%脱脂奶粉和百分比浓度0.05%吐温-20的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,室温条件下混匀2~3h,再磁分离,去上清,用磁微粒缓冲液稀释重悬到0.5mg/mL,在2~8℃下平衡16~24h,室温条件下混匀2~3h后,使用超声振荡仪将混悬液中聚集成团的磁珠分散成单颗粒状态,得到所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂。

3.根据权利要求2所述一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括清洗液的制备步骤:

加800mL纯化水、12.1g的Tris和8.5g的NaCl于1L容器中,搅拌至完全溶解,再加入5g的吐温-20和5g的Triton100,搅拌,直至完全混匀,将pH值调为7.5-8.0,定容1L,使用0.2μm过滤器过滤,将获得的所述清洗液保存在2-8℃待用。

4. 一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

步骤1. 将Anti-SS-A IgG校准品放到全自动化学发光免疫分析仪测试位置,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出的拟合曲线;

步骤2. 将Anti-SS-A IgG质控品放到上述分析仪测试位置,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出的所述质控品的测试发光值和通过步骤1得到的拟合曲线拟合得到Anti-SS-A IgG质控品的浓度值;

步骤3. 将待测样本放到上述分析仪测试位置,由所述分析仪自动按1:20将样本稀释,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出的待测样本的浓度值。

5. 根据权利要求4所述的一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的检测方法,其特征在于:所述步骤1、步骤2和步骤3均包括全自动化学发光免疫分析仪的全自动检测步骤:

步骤1) 加20 μ L校准品或质控品或1:20稀释后的待测标本至检测管中;

步骤2) 加50 μ L的Anti-SS-A IgG试剂1号至步骤1)所述检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C温育10min;

步骤3) 加50 μ L的Anti-SS-A IgG磁分离试剂至步骤2)所述检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C温育5min,进行磁分离,去上清;

步骤4) 加300 μ L的清洗液至检测管中,混匀,进行磁分离,去上清;

步骤5) 重复步骤4)两遍;

步骤6) 加150 μ L Anti-SS-A IgG试剂2号至检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C温育10min,进行磁分离,去上清;

步骤7) 加300 μ L的清洗液至检测管中,混匀,进行磁分离,去上清;

步骤8) 重复步骤7)两遍;

步骤9) 加200 μ L的化学发光底物至检测管中,混匀,检测发光强度。

一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测技术领域,具体涉及一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 抗SS-A抗体与各种自身免疫性疾病相关,常见于干燥综合征、系统性红斑狼疮、慢性活动性肝炎患者。此外,在100%的新生儿红斑狼疮中也可检出抗SS-A抗体,抗SS-A抗体可经胎盘传给胎儿,引起炎症反应,还可导致新生儿先天性心脏传导阻滞。SS-A抗体在其他疾病以及正常人血清中阳性率很低、抗体效价亦低,结合临床表现较易鉴别。

[0003] 目前临床上抗SS-A抗体IgG的检测有的膜条免疫法和酶联免疫吸附法。膜条免疫法应用的是膜条显色技术,其特点为固定几个项目在同一膜条测定,一般通过手工或者半自动膜条仪进行实验操作,最终通过肉眼进行定性判定,该技术灵敏度低,反应时间长,检测项目只能固定搭配组合,灵活性差。酶联免疫吸附法的灵敏度在膜条免疫法基础上有所提升,但仍然较低,并且线性范围窄,重复性差,反应时间也较长,仍然不能很好满足临床的应用。

[0004] 磁微粒化学发光免疫分析法,较以前的膜条免疫法和酶联免疫吸附法,在检测灵敏度、检测范围、检测时间及自动化操作上有了大大提高,且没有污染,临床应用广。目前,使用磁微粒化学发光分析法在抗SS-A抗体IgG免疫分析产品的应用仍未见。

[0005] 中国专利CN103105489A公开了检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法,涉及一种检测多种自身免疫性疾病相关抗体的免疫印迹试剂盒,解决目前尚无用于多种自身免疫性疾病体检筛查的免疫印迹产品技术上的不足:在所述的确酸纤维素膜或尼龙膜上含有:分别由dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG、AMA-M2共10种中的至少两种天然或重组抗原包被而成的两条以上平行的检测线,1条高浓度质控带,1条中浓度质控带及1条低浓度质控带。该专利公开的是一种膜条免疫法,更能说明膜条免疫法存在的灵敏度较低、线性范围窄、重复性差和反应时间长的问题。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术中的缺陷,本发明提供一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒,能够低成本制备得到,且能够实现抗SS-A抗体IgG准确和高精确地定量测定。

[0007] 本发明是通过如下技术方案来实现的:一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒,所述试剂盒包括:Anti-SS-A IgG校准品、Anti-SS-A IgG试剂1号、Anti-SS-A IgG试剂2号、Anti-SS-A IgG磁分离试剂、Anti-SS-A IgG质控品和清洗液。

[0008] 所述Anti-SS-A IgG校准品包括6个液体校准瓶,所述液体校准瓶内目标浓度分别为0、5、20、50、100、200RU/mL的Anti-SS-A IgG和牛血清白蛋白的Tris缓冲液;

[0009] 所述Anti-SS-A IgG试剂1号为1个含有生物素标记的SS-A抗原和牛血清白蛋白的Tris缓冲液的瓶；

[0010] 所述Anti-SS-A IgG试剂2号为1个含有碱性磷酸酶标记的羊抗人多克隆抗体和牛血清白蛋白的Tris缓冲液的瓶；

[0011] 所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂为1个含有链霉亲和素标记的磁微粒和牛血清白蛋白的Tris缓冲液瓶；

[0012] 所述Anti-SS-A IgG质控品包括2个质控瓶,所述质控瓶内的浓度的范围分别为:16-24RU/mL和80-120RU/mL。

[0013] 所述试剂盒检测原理为将待测样品、所述Anti-SS-A IgG试剂1号混合温育,样品中的抗SS-A抗体IgG与SS-A抗原特异性结合,再加入所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂,抗SS-A抗体IgG与SS-A抗原的免疫复合物被吸附到磁微粒表面,洗涤去除未结合的抗体和杂质,加入Anti-SS-A IgG试剂2号并混合温育。碱性磷酸酶标记(ALP)的羊抗人IgG抗体与已经结合在磁珠上的抗SS-A抗体IgG特异性结合。洗涤去除未结合的抗体和杂质后加入化学发光底物,ALP催化底物发光,测定相对发光强度(RLU)。在一定范围内RLU与样品中抗SS-A抗体IgG浓度呈正比,通过RLU就可以从标准曲线上计算出待测样品的抗SS-A抗体IgG含量。

[0014] 本发明采取的又一技术方案是:一种抗SS-A抗体IgG的磁微粒化学发光定量检测试剂盒的制备方法,所述试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0015] 步骤1.制备所述Anti-SS-A IgG校准品包括:Anti-SS-A IgG校准品稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG校准品配制步骤:

[0016] 所述Anti-SS-A IgG校准品稀释液的配制步骤包括:

[0017] 加800mL纯化水和11.2g的Tris到容器中,搅拌混合均匀,再加8.5g的氯化钠和2mL的Proclin300,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.0-7.5,加40g的牛血清白蛋白到容器中,搅拌至完全溶解,再将pH值调为7.0-7.5,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述校准品稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

[0018] 所述Anti-SS-A IgG校准品的配制步骤包括:

[0019] 用上述Anti-SS-A IgG校准品稀释液将抗SS-A抗体IgG分别配制为0、5、20、50、100、200RU/mL共6个浓度点;

[0020] 步骤2.制备所述Anti-SS-A IgG试剂1号包括:Anti-SS-A IgG试剂1号稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG试剂1号配制步骤:

[0021] 所述Anti-SS-A IgG试剂1号稀释液的配制步骤:

[0022] 加800mL纯化水、12.1g的Tris和5.8g的NaCl于1L容器中,搅拌至完全溶解,再加入2mL的Proclin300,搅拌至完全溶解,再加入5g的牛血清白蛋白,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.0-7.5,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述试剂1号稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

[0023] 所述Anti-SS-A IgG试剂1号的配制步骤:

[0024] 用0.2mol/L的pH9.0碳酸盐缓冲液配制0.5mg/mL的生物素溶液,按照SS-A抗原与生物素溶液质量比为10:1的比例在SS-A抗原溶液中加入到上述0.5mg/mL的生物素溶液,混合均匀,室温静置18h,反应生成SS-A抗原-生物素连接物的反应液,将得到的SS-A抗原-生物素连接物反应液通过G-25凝胶柱进行分离,除去未反应的生物素,得到SS-A抗原-生物素

连接物,再用所述试剂1号稀释液将SS-A抗原-生物素连接物稀释到0.1-0.3 μ g/mL,得到所述的试剂1号;

[0025] 步骤3.制备所述Anti-SS-A IgG试剂2号包括:Anti-SS-A IgG试剂2号稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG试剂2号的配制步骤:

[0026] 所述Anti-SS-A IgG试剂2号稀释液的配制步骤:

[0027] 加800mL纯化水、6.06g的4-羟乙基哌嗪乙磺和8.5g的NaCl到容器中,搅拌至完全溶解,再加入5g的牛血清白蛋白、0.1g的ZnCl₂、0.2mL的Proclin 300和0.1g的MgCl₂,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.5-8.0,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述试剂2号稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

[0028] 所述Anti-SS-A IgG试剂2号的配制步骤:

[0029] 将1mg的羊抗人抗体和2-4 μ L的10mg/mL的偶联剂为2-亚胺四氢噻吩溶液,室温静置20min,加入0.1mol/L的甘氨酸溶液10 μ L,室温静置5min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后抗体,将活化后的抗体保存在2-8 $^{\circ}$ C备用,取1.5mg的碱性磷酸酶,加入5mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液10-20 μ L,室温静置30min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,将活化后的碱性磷酸酶保存在2-8 $^{\circ}$ C备用,再将上述活化的羊抗人抗体与活化的碱性磷酸酶混合,在2-8 $^{\circ}$ C条件下静置12-24h,用Superdex200凝胶纯化柱纯化,获得羊抗人抗体-碱性磷酸酶连接物浓溶液,置于2-8 $^{\circ}$ C保存备用,将羊抗人抗体-碱性磷酸酶连接物浓溶液用所述试剂2号稀释液稀释到0.02-0.1 μ g/mL,得到所述的试剂2号;

[0030] 步骤4.制备所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂包括:Anti-SS-A IgG磁分离试剂稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG磁分离试剂配制步骤:

[0031] 所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂稀释液配制步骤:

[0032] 加800mL纯化水、12.1g的Tris和8.5g的NaCl到容器中,搅拌至完全溶解,再加5g的牛血清白蛋白、50mL的新生牛血清和0.2mL的Proclin300,搅拌至完全溶解,将pH值调为7.9-8.1,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述磁分离试剂稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

[0033] 所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂配制步骤:

[0034] 取100mg磁微粒,磁分离去上清,取用0.025mol/L的pH值为4.5-6的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,室温下混匀2~3h,加入0.5-1.0mL新配制的浓度为10mg/mL的碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的2-吗啉乙磺酸缓冲液,室温振荡混悬30-60min,使磁珠充分活化,磁分离,去上清,用0.025mol/L的pH值为4.5-6的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,加入4-8mg的链霉亲和素,室温混悬16-20h,再进行磁分离,去上清,用百分比浓度0.5%的牛血清白蛋白,百分比浓度0.5%脱脂奶粉和百分比浓度0.05%吐温-20的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,室温条件下混匀2~3h,再磁分离,去上清,用磁微粒缓冲液稀释重悬到0.5mg/mL,在2~8 $^{\circ}$ C下平衡16~24h,室温条件下混匀2~3h后,使用超声振荡仪将混悬液中聚集成团的磁珠分散成单颗粒状态,得到所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂。

[0035] 进一步的,本发明还提供所述清洗液的制备步骤:

[0036] 加800mL纯化水、12.1g的Tris和8.5g的NaCl于1L容器中,搅拌至完全溶解,再加入5g的吐温-20和5g的Triton100,搅拌,直至完全混匀,将pH值调为7.5-8.0,定容1L,使用0.2

μm 滤器过滤,将获得的所述清洗液保存在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

[0037] 本发明还提供了一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的检测方法,所述试剂盒的检测方法包括以下步骤:

[0038] 步骤1.将Anti-SS-A IgG校准品放到全自动化学发光免疫分析仪测试位置,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出的拟合曲线;

[0039] 步骤2.将Anti-SS-A IgG质控品放到上述分析仪测试位置,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出的所述质控品的测试发光值和通过步骤1得到的拟合曲线拟合得到Anti-SS-AIgG质控品的浓度值;

[0040] 步骤3.将待测样品放到上述分析仪测试位置,由所述分析仪自动按1:20将样品稀释,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出的待测样品的浓度值。

[0041] 进一步,本发明提供了所述的一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的检测方法,所述步骤1、步骤2和步骤3均包括全自动化学发光免疫分析仪的全自动检测步骤:

[0042] 步骤1)加20 μL 校准品或质控品或1:20稀释后的待测标本至检测管中;

[0043] 步骤2)加50 μL 的Anti-SS-A IgG试剂1号至步骤1)所述检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 温育10min;

[0044] 步骤3)加50 μL 的Anti-SS-A IgG磁分离试剂至步骤2)所述检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 温育5min,进行磁分离,去上清;

[0045] 步骤4)加300 μL 的清洗液至检测管中,混匀,进行磁分离,去上清;

[0046] 步骤5)重复步骤4)两遍;

[0047] 步骤6)加150 μL Anti-SS-A IgG试剂2号至检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 温育10min,进行磁分离,去上清;

[0048] 步骤7)加300 μL 的清洗液至检测管中,混匀,进行磁分离,去上清;

[0049] 步骤8)重复步骤7)两遍;

[0050] 步骤9)加200 μL 的化学发光底物至检测管中,混匀,检测发光强度。

[0051] 与现有技术相比,有益效果在于:

[0052] 1、所述试剂盒中的Anti-SS-A IgG试剂1号、Anti-SS-A IgG试剂2号、Anti-SS-A IgG磁分离试剂是该反应体系下的更优配方,给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0053] 2、所述试剂盒中的Anti-SS-A IgG磁分离试剂参与反应时间仅为5分钟,大限度地避免非特异性吸附。

[0054] 3、所述试剂盒中的Anti-SS-A IgG磁分离试剂为高分散性的超顺磁性微粒,保证磁微粒在保存和使用过程中完全不会发生聚集。

[0055] 4、所述试剂盒中的Anti-SS-A IgG试剂2号中的碱性磷酸酶可催化发光底物发光,且5秒钟即达发光反应平台期,并保持平稳的光信号,保证高检测精度和效率。

[0056] 5、所述试剂盒中的Anti-SS-A IgG试剂2号是碱性磷酸酶标记的羊抗人多克隆抗体,羊抗人多克隆抗体的使用,降低了试剂盒的成本。

[0057] 6、本试剂盒成功避免与抗核糖体P蛋白抗体、抗RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-B抗体、抗Scl-70抗体、抗Jo-1抗体、抗着丝点抗体的交叉反应。

[0058] 7、所述试剂盒中的待测标本需要量为1:20倍稀释后的20 μ L标本,降低了试剂盒的成本。

[0059] 8、所述检测方法在传统的膜条免疫法和酶联免疫吸附法的基础上,将灵敏度和线性范围再提高3-5个数量级、实现真正意义的定量检测,具有灵敏度高、特异性强、准确度高等特点。

[0060] 9、所述检测方法配合全自动化学发光免疫分析仪实现全自动使用,操作简便,结果判断客观等优点,对于临床诊断具有重要价值,应用前景广阔。

附图说明

[0061] 图1为本发明所述抗SS-A抗体IgG的试剂盒的空白限评价测试中A,B点连点拟合曲线示意图;

[0062] 图2为本发明所述的抗SS-A抗体IgG的试剂盒线性范围评价的曲线图;

[0063] 图3为本发明所述的试剂盒的磁微粒化学发光定量测定血清检测结果与商品化的抗SS-A抗体IgG检测试剂盒酶联免疫吸附法检测结果的相关性评价;

[0064] 图3中的横坐标x为对比方法的试剂盒样品测值,浓度单位为RU/mL,纵坐标y为所述试剂盒样品测值,浓度单位为RU/mL。

具体实施方式

[0065] 实施例1

[0066] 一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒,该试剂盒包括:Anti-SS-AIgG校准品、Anti-SS-A IgG试剂1号、Anti-SS-A IgG试剂2号、Anti-SS-A IgG磁分离试剂、Anti-SS-A IgG质控品和清洗液。

[0067] 所述Anti-SS-A IgG校准品包括6个装量为0.5mL的液体校准瓶,所述液体校准瓶内目标浓度分别为0、5、20、50、100、200RU/mL的Anti-SS-A IgG和牛血清白蛋白的Tris缓冲液;

[0068] 所述Anti-SS-A IgG试剂1号为1个装量为5mL的含有生物素标记的Anti-SS-A抗原和牛血清白蛋白的Tris缓冲液的瓶;

[0069] 所述Anti-SS-A IgG试剂2号为1个装量为15mL的含有碱性磷酸酶标记的羊抗人多克隆抗体和牛血清白蛋白的Tris缓冲液的瓶;

[0070] 所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂为1个装量为5mL的含有链霉亲和素标记的磁微粒和牛血清白蛋白的Tris缓冲液瓶;

[0071] 所述Anti-SS-A IgG质控品包括2个装量为1mL的质控瓶,所述质控瓶内的浓度的范围分别为:16-24RU/mL和80-120RU/mL。

[0072] 本发明所述试剂盒的分析性能评价:

[0073] 1)准确度评价

[0074] 将浓度约为200RU/mL,允许其浓度偏差为 $\pm 20\%$ 的抗SS-A抗体IgG样品A液加入到血清样品B液中,所加入A液的体积不超过总体积A+B的10%,根据公式(1)计算回收率R,本方法的回收率在85-115%范围内,数据参见表1。

[0075]
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \cdot V_0}{V \times C_s} \times 100\% \dots\dots (1)$$

[0076] R:回收率;

[0077] V:样品A液的体积;

[0078] V₀:样品B液的体积;

[0079] C:样品B液加入A液后的检测浓度;

[0080] C₀:测量B液的检测浓度;

[0081] C_s:样品A液的浓度。

[0082] 表1-准确度评价—添加回收实验数据

[0083]

样品	样品 B 液中 加入 A 液后 的检测发光 值	C-样品 B 液 中加入 A 液 后的检测浓 度 (RU/mL)	样品 B 液的 发光值	C ₀ -样品B液 的浓度值	C _s -样品A液 的浓度值 (RU/mL)
测试 1	269167	20.16	4920	0.18	200
测试 2	258984	19.34	6033	0.25	
测试 3	281045	21.12	3290	0.08	
平均值	/	20.21	/	0.17	
回收率 R	100.27%				

[0084] 2)空白限评价

[0085] 用零浓度校准品作为样品进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的RLU,RLU为相对发光值,计算其平均值M和标准差SD,得出M+2SD所对应的RLU值,根据零浓度校准品与相邻校准品之间的浓度-RLU值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD所对应的RLU值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为空白限。本方法的空白限不大于1RU/mL。具体数据参见表2,A、B点连点拟合曲线如图1所示。

[0086] 表2空白限评价

[0087]

A 浓度 (RU/mL)	0				
B 浓度 (RU/mL)	5				
A 发光值	5734	5683	5590	6272	5939
	6032	5624	6090	5832	5813
	6077	5652	5636	6131	6145
	5975	6356	6359	5544	5596
B 发光值	72015	72914			
A 点发光均值 (M)	5904				
B 点发光均值	73361				
A 点发光标准 差 (SD)	269				
M+2SD	6441				
空 白 限 (RU/mL)	0.040				

[0088] 3)线性范围评价

[0089] 将接近线性范围上限为200RU/mL的高值样品按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度的样品须接近线性范围的下限。按试剂盒说明书进行操作,对每一浓度的样品均重复检测2次,计算其平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 r ,本方法的线性范围为2~200RU/mL,相关系数 r 应 ≥ 0.9900 。数据参见表3。曲线见图2。

[0090] 表3线性范围评价

[0091]

线性高值浓度	180				
稀释梯度	1/81	1/27	1/9	1/3	1
测试 1 浓度 (RU/mL)	2.37	6.41	21.79	58.22	181.58
测试 2 浓度 (RU/mL)	2.23	6.09	20.85	61.45	188.02
浓度均值	2.30	6.25	21.32	59.83	184.80
相关系数 r	0.9999				

[0092] 4)重复性评价

[0093] 取本实施例中的试剂盒重复检测浓度为 20 ± 4 RU/mL和 100 ± 20 RU/mL的样品各10次,计算10次测量结果的平均值 M 和标准差 SD ,根据公式 $CV = SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV ,本方法变异系数(CV)不大于8%。数据参见表4。

[0094] $CV=SD/M \times 100\% \dots\dots(2)$

[0095] 式中:CV—变异系数;SD—10次测量结果的标准差;M—10次测量结果的平均值。

[0096] 表4重复性评价

测定血清浓度 (RU/mL)	测定次数	分析间 CV(%)
20	10	5.66%
100	10	6.31%

[0098] 5)批间差评价

[0099] 将实施例的试剂盒取三批,每批试剂盒均测定浓度在 $20 \pm 4RU/mL$ 和 $100 \pm 20RU/mL$ 范围内的样品,每批重复测定10次,计算30次测定结果的平均值(M)和标准差(SD),根据公式(3)计算变异系数(CV),本方法变异系数(CV)不大于15%。数据参见表5。

[0100] $CV=SD/M \times 100\% \dots\dots(3)$

[0101] 公式中:CV—变异系数;SD—30次测定结果的标准差;M—30次测定结果的平均值。

[0102] 表5批间差评价

测定血清浓度 (RU/mL)	测定次数	分析间 CV(%)
20	30	6.94%
100	30	6.06%

[0104] 6)特异性评价

[0105] 取7份Anti-SS-A IgG含量为0的样品,分别加入抗核糖体P蛋白抗体、抗RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-B抗体、抗Sc1-70抗体、抗Jo-1抗体、抗着丝点抗体,使样品中交叉反应物浓度为200RU/mL,使用该试剂盒对该样品进行检测,测定样品中的Anti-SS-A IgG含量。结果见表6,本方法与抗核糖体P蛋白抗体、抗RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-B抗体、抗Sc1-70抗体、抗Jo-1抗体、抗着丝点抗体无交叉反应。数据参见表6。

[0106] 表6特异性实验

[0107]

测试交叉反应物	浓度(RU/mL)	RLU	测定结果(RU/mL)
抗核糖体P蛋白抗体	200	2468	<1
抗RNP抗体	200	3518	<1
抗Sm抗体	200	2691	<1
抗SS-B抗体	200	3337	<1
抗Sc1-70抗体	200	4128	<1
抗Jo-1抗体	200	3542	<1
抗着丝点抗体	200	2784	<1

[0108] 7)相关性评价

[0109] 用实施例的试剂盒和商品化的抗SS-A抗体IgG检测试剂盒酶联免疫吸附法对240份人血清样品同时进行检测。其检测结果如图3所示,以抗SS-A抗体IgG检测试剂盒酶联免疫吸附法测定的结果为横坐标,以本发明方法的测定的结果为纵坐标作回归分析,相关方

程： $y=0.9519x+0.2352$ ，相关系数为 $R^2:0.9855$ 。经统计学处理结果表明，本方法同其他方法的试剂盒临床样品测值相关性良好。

[0110] 8)稳定性评价

[0111] 取所述试剂盒分别在4℃下12个月实时稳定性实验和在37℃下7天的进行稳定性实验，结果表明试剂盒准确度、空白限、线性、重复性和质控品的赋值有效性等指标均在正常范围之内，试剂盒有效期可达12个月。数据见表7和表8。

[0112] 表7试剂盒4℃稳定性实验

[0113]

4℃储存时间	准确度 (回收率)	空白限	线性	重复性 (20±4) RU/mL	重复性 (100±20) RU/mL	质控品的赋值有效性 QC1	质控品的赋值有效性 QC2
第0天	96.58%	0.015	0.9998	7.68%	4.54%	20.24	96.63
第3个月	106.48%	0.013	0.9995	5.27%	3.76%	20.43	103.02
第6个月	92.00%	0.013	0.9994	6.41%	4.51%	20.55	100.21
第9个月	102.50%	0.015	0.9997	5.18%	6.57%	18.94	101.47
第11个月	110.88%	0.015	0.9998	4.01%	3.62%	19.60	102.27
第12个月	104.35%	0.018	0.9995	6.30%	4.67%	20.46	100.47

[0114] 表8试剂盒37℃稳定性实验

[0115]

37℃储存时间	准确度 (回收率)	空白限	线性	重复性 (20±4) RU/mL	重复性 (100±20) RU/mL	质控品的赋值有效性 QC1	质控品的赋值有效性 QC2
第0天	96.58%	0.015	0.9998	7.68%	4.54%	20.24	96.63
第1天	108.90%	0.012	0.9994	4.90%	5.38%	20.28	102.26
第4天	90.35%	0.015	1.0000	7.11%	6.01%	19.88	100.33
第7天	98.90%	0.016	0.9999	7.28%	6.01%	20.04	101.32

[0116] 实施例2

[0117] 一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒的制备方法包括以下步骤：

[0118] 步骤1.制备所述Anti-SS-A IgG校准品包括：Anti-SS-A IgG校准品稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG校准品配制步骤：

[0119] 所述Anti-SS-A IgG校准品稀释液的配制步骤包括：

[0120] 加800mL纯化水和11.2g的Tris到容器中，搅拌混合均匀，再加8.5g的氯化钠和2mL的Proclin300，搅拌至完全溶解，将pH值调为7.0-7.5，加40g的牛血清白蛋白到容器中，搅拌至完全溶解，再将pH值调为7.0-7.5，用纯化水定容至1L，使用0.2μm滤器过滤，将获得的所述校准品稀释液保存在2-8℃待用；

[0121] 所述Anti-SS-A IgG校准品的配制步骤包括：

[0122] 用上述Anti-SS-A IgG校准品稀释液将抗SS-A抗体IgG分别配制为0、5、20、50、100、200RU/mL共6个浓度点；

[0123] 步骤2.制备所述Anti-SS-A IgG试剂1号包括：Anti-SS-A IgG试剂1号稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG试剂1号配制步骤：

[0124] 所述Anti-SS-A IgG试剂1号稀释液的配制步骤：

[0125] 加800mL纯化水、12.1g的Tris和5.8g的NaCl于1L容器中，搅拌至完全溶解，再加入2mL的Proclin300，搅拌至完全溶解，再加入5g的牛血清白蛋白，搅拌至完全溶解，将pH值调为7.0-7.5，用纯化水定容至1L，使用0.2 μ m滤器过滤，将获得的所述试剂1号稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用；

[0126] 所述Anti-SS-A IgG试剂1号的配制步骤：

[0127] 用0.2mol/L的pH9.0碳酸盐缓冲液配制0.5mg/mL的生物素溶液，按照SS-A抗原与生物素溶液质量比为10:1的比例在SS-A抗原溶液中加入到上述0.5mg/mL的生物素溶液，混合均匀，室温静置18h，反应生成SS-A抗原-生物素连接物的反应液，将得到的SS-A抗原-生物素连接物反应液通过G-25凝胶柱进行分离，除去未反应的生物素，得到SS-A抗原-生物素连接物，再用所述试剂1号稀释液将SS-A抗原-生物素连接物稀释到0.1-0.3 μ g/mL，得到所述的试剂1号；

[0128] 步骤3.制备所述Anti-SS-A IgG试剂2号包括：Anti-SS-A IgG试剂2号稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG试剂2号的配制步骤：

[0129] 所述Anti-SS-A IgG试剂2号稀释液的配制步骤：

[0130] 加800mL纯化水、6.06g的4-羟乙基哌嗪乙磺和8.5g的NaCl到容器中，搅拌至完全溶解，再加入5g的牛血清白蛋白、0.1g的ZnCl₂、0.2mL的Proclin 300和0.1g的MgCl₂，搅拌至完全溶解，将pH值调为7.5-8.0，用纯化水定容至1L，使用0.2 μ m滤器过滤，将获得的所述试剂2号稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用；

[0131] 所述Anti-SS-A IgG试剂2号的配制步骤：

[0132] 将1mg的羊抗人抗体和2-4 μ L的10mg/mL的偶联剂为2-亚胺四氢噻吩溶液，室温静置20min，加入0.1mol/L的甘氨酸溶液10 μ L，室温静置5min，用G-25凝胶柱除盐，收集活化后抗体，将活化后的抗体保存在2-8 $^{\circ}$ C备用，取1.5mg的碱性磷酸酶，加入5mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液10-20 μ L，室温静置30min，用G-25凝胶柱除盐，收集活化后碱性磷酸酶，将活化后的碱性磷酸酶保存在2-8 $^{\circ}$ C备用，再将上述活化的羊抗人抗体与活化的碱性磷酸酶混合，在2-8 $^{\circ}$ C条件下静置12-24h，用Superdex200凝胶纯化柱纯化，获得羊抗人抗体-碱性磷酸酶连接物浓溶液，置于2-8 $^{\circ}$ C保存备用，将羊抗人抗体-碱性磷酸酶连接物浓溶液用所述试剂2号稀释液稀释到0.02-0.1 μ g/mL，得到所述的试剂2号；

[0133] 步骤4.制备所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂包括：Anti-SS-A IgG磁分离试剂稀释液配制步骤和Anti-SS-A IgG磁分离试剂配制步骤：

[0134] 所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂稀释液配制步骤：

[0135] 加800mL纯化水、12.1g的Tris和8.5g的NaCl到容器中，搅拌至完全溶解，再加5g的牛血清白蛋白、50mL的新生牛血清和0.2mL的Proclin300，搅拌至完全溶解，将pH值调为

7.9-8.1,用纯化水定容至1L,使用0.2 μ m滤器过滤,将获得的所述磁分离试剂稀释液保存在2-8 $^{\circ}$ C待用;

[0136] 所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂配制步骤:

[0137] 取100mg磁微粒,磁分离去上清,取用0.025mol/L的pH值为4.5-6的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,室温下混匀2~3h,加入0.5-1.0mL新配制的浓度为10mg/mL的碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的2-吗啉乙磺酸缓冲液,室温振荡混悬30-60min,使磁珠充分活化,磁分离,去上清,用0.025mol/L的pH值为4.5-6的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,加入4-8mg的链霉亲和素,室温混悬16-20h,再进行磁分离,去上清,用百分比浓度0.5%的牛血清白蛋白,百分比浓度0.5%脱脂奶粉和百分比浓度0.05%吐温-20的2-吗啉乙磺酸缓冲液10mL重悬,室温条件下混匀2~3h,再磁分离,去上清,用磁微粒缓冲液稀释重悬到0.5mg/mL,在2~8 $^{\circ}$ C下平衡16~24h,室温条件下混匀2~3h后,使用超声振荡仪将混悬液中聚集成团的磁珠分散成单颗粒状态,得到所述Anti-SS-A IgG磁分离试剂。

[0138] 实施例3

[0139] 在实施例2的基础上,所述试剂盒还包括清洗液,所述清洗液的制备步骤:

[0140] 加800mL纯化水、Tris 12.1g和NaCl 8.5g于1L容器中,充分搅拌至完全溶解;再加入5g的吐温-20和5g的Triton100,充分搅拌,直至完全混匀,调pH值控制在7.5-8.0,定容1L,用0.2 μ m滤器过滤,温度为2-8 $^{\circ}$ C范围进行保存。实验前将所述清洗液按照每7.5mL加纯化水至100mL比例稀释并混匀后再使用。

[0141] 实施例4

[0142] 采用所述试剂盒应用于一种抗SS-A抗体IgG的检测方法,包括的检测步骤:

[0143] 1)将试剂盒中的Anti-SS-A IgG-R1,Anti-SS-A IgG-R2,Anti-SS-A IgG-M三个组分放置于本公司研制的全自动化学发光免疫分析仪试剂舱中;

[0144] 2)在仪器软件上进行定标曲线,将Anti-SS-A IgG校准品放到仪器测试位置,得到由全自动化学发光免疫分析仪输出拟合曲线;

[0145] 3)如果仪器提示拟合通过,则在仪器软件上进行质控品测试申请,将Anti-SS-A IgG质控品放到仪器指定位置。得到由全自动化学发光免疫分析仪输出质控品测试发光值和通过标准曲线拟合得到的质控品的浓度值。

[0146] 4)如果质控测值在预定范围内,即可进行样品测试申请,将样品放到仪器测试位置。由全自动化学发光免疫分析仪输出样品测试发光值和通过标准曲线拟合得到的浓度值。

[0147] 5)全自动化学发光免疫分析仪检测步骤如下:

[0148] 步骤1)加20 μ L校准品或质控品或1:20稀释后的待测标本至检测管中;

[0149] 步骤2)加50 μ L Anti-SS-A IgG试剂1号至步骤1)所述检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C温育10分钟;

[0150] 步骤3)加50 μ L Anti-SS-A IgG磁分离试剂至步骤2)所述检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C温育5分钟;进行磁分离,去上清;

[0151] 步骤4)加300 μ L清洗液至检测管中,混匀;进行磁分离去上清;

[0152] 步骤5)重复步骤4)两遍;

[0153] 步骤6)加150 μ L Anti-SS-A IgG试剂2号至检测管中,混匀后,37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C温育10分

钟;进行磁分离去上清;

[0154] 步骤7)加300 μ L清洗液至检测管中,混匀;进行磁分离去上清;

[0155] 步骤8)重复步骤7)两遍;

[0156] 步骤9)加200 μ L化学发光底物至检测管中,混匀,检测发光强度。

[0157] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

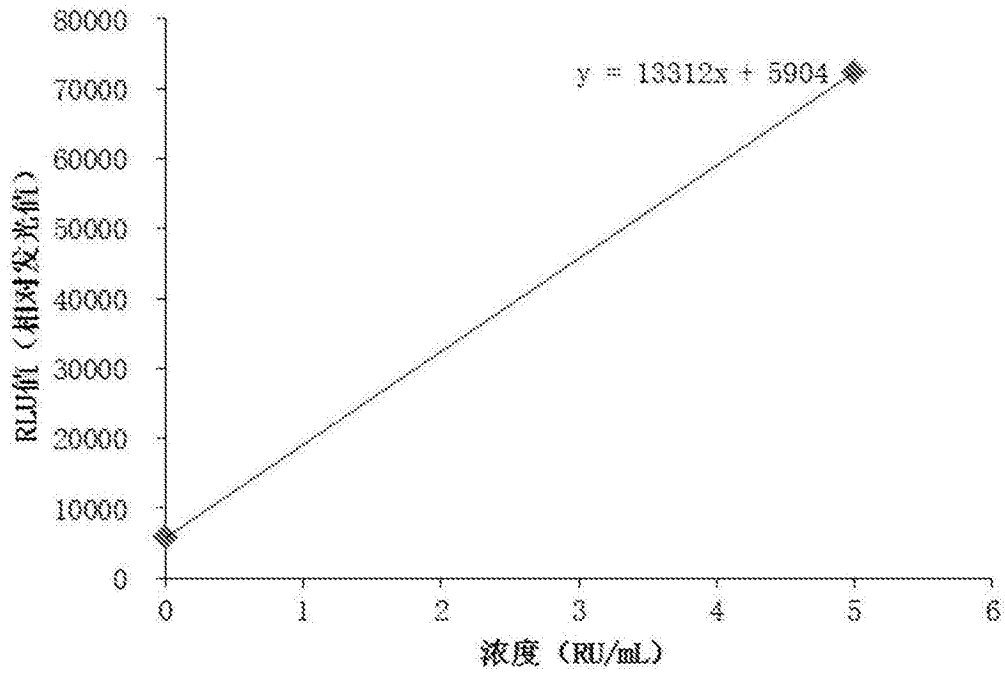


图1

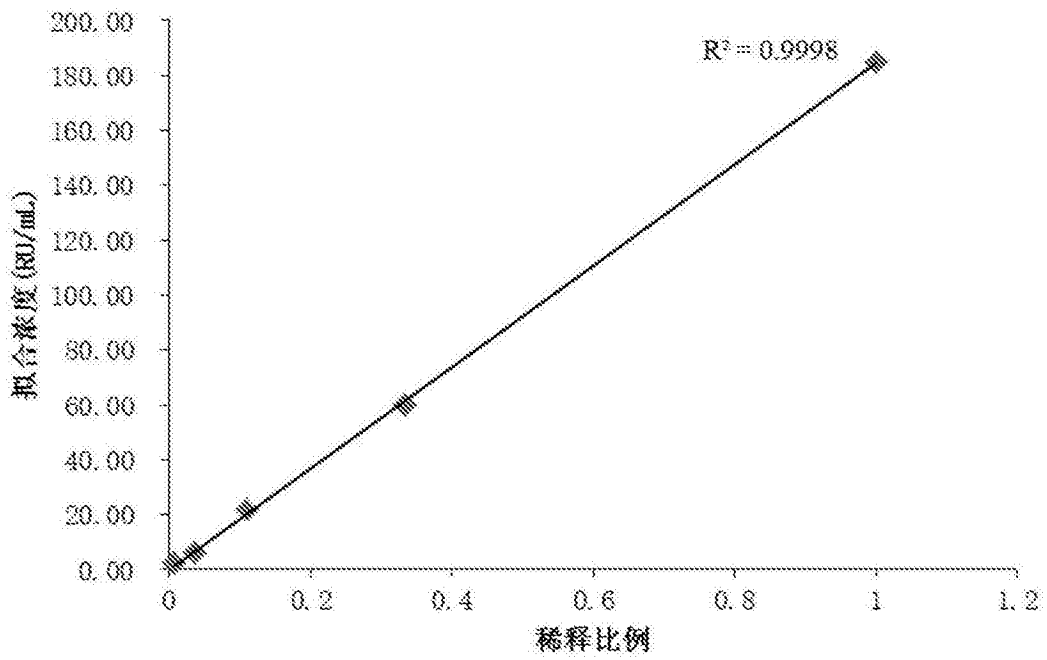


图2

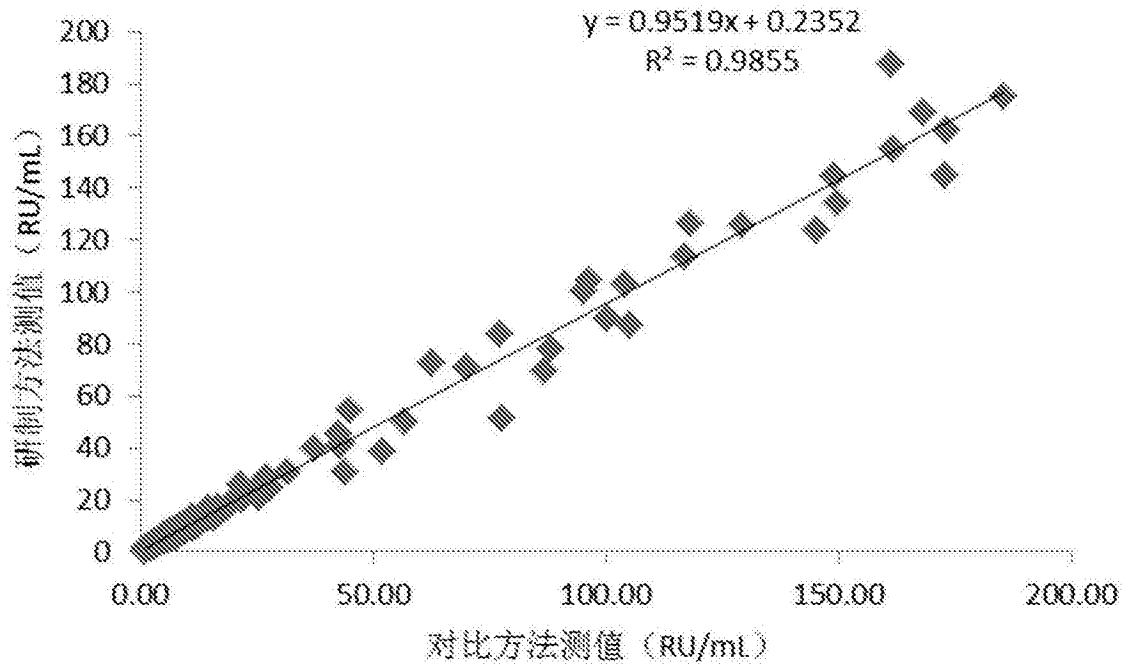


图3

专利名称(译)	一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN105445456A	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201510785574.9	申请日	2015-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/531		
代理人(译)	胡静		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)
 本发明涉及免疫学检测技术领域，具体涉及一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒及其制备方法和检测方法。本发明提供一种使用磁微粒化学发光定量检测抗SS-A抗体IgG的试剂盒，包括Anti-SS-A ? IgG校准品、Anti-SS-A ? IgG试剂1号、Anti-SS-A ? IgG试剂2号、Anti-SS-A ? IgG磁分离试剂、Anti-SS-A ? IgG质控品和清洗液。本发明还公开了上述试剂盒的制备和检测方法。该检测方法在传统的膜条免疫法和酶联免疫吸附法的基础上，将灵敏度和线性范围再提高3-5个数量级、实现了定量检测，具有敏感度高、特异性强、准确性好、成本低、操作简便和结果判断客观优点，并配合全自动化学发光免疫分析仪实现全自动使用，具有广阔的应用前景。

