



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106124774 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(21)申请号 201610431512.2

(22)申请日 2016.06.17

(71)申请人 上海执诚生物科技有限公司

地址 201318 上海市浦东新区康新公路  
3399弄6号

(72)发明人 王军峰 王咏 孟菲

(74)专利代理机构 上海领洋专利代理事务所

(普通合伙) 31292

代理人 刘秋兰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒,其包括:试剂A,所述试剂A为pH=8.0~9.4的甘氨酸缓冲体系,含有0.1~0.5g/L的高分子促聚剂、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质;以及试剂B,所述试剂B为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,含有1.5~2g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5~10mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质。本发明还公开了制备试剂B的方法。所述试剂盒可用于人补体C4的测定,可有效避免非特异性反应,检测灵敏度较高,且具有较低的检测限。

1. 一种基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

试剂A,所述试剂A为pH=8.0~9.4的甘氨酸缓冲体系,含有0.1~0.5g/L的高分子促聚剂、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质;

以及试剂B,所述试剂B为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,含有1.5~2g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5~10mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述胶乳为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,是粒径为30~80nm优选40~50nm的羧基微球经NHS和EDC活化后再由羊抗人补体C4多克隆抗体包被得到的胶乳;所述胶乳中,羧基微球的浓度为1~2g/L优选1g/L,NHS与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1,EDC与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1,包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂A和所述试剂B分别还含有0.5~1g/L的防腐剂,所述防腐剂为proclin300和/或叠氮钠。

4. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂A中的高分子促聚剂为聚乙二醇6000,聚乙二醇6000在所述试剂A中的浓度为0.2~0.5g/L;所述试剂A和所述试剂B中的表面活性剂均为曲拉通X100;所述试剂A和所述试剂B中的电解质均为氯化钠。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂A为pH=8.6的100mmol/L甘氨酸缓冲体系,含有0.5g/L的聚乙二醇6000、1g/L的曲拉通X100、5g/L的氯化钠和1g/L的叠氮钠。

6. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂B为pH=6.8的50mmol/L MES缓冲体系,含有1.8g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1g/L的曲拉通X100、5g/L的氯化钠和1g/L的叠氮钠。

7. 一种制备试剂B的方法,其特征在于,所述试剂B为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,含有1.5~2g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5~10mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质;

该方法包括如下步骤:

1) 用pH=6.5~7.3的MES缓冲液将羧基微球稀释至1~2g/L,再加入NHS和EDC,15~25℃下反应20~30分钟得到活化胶乳;

2) 向活化胶乳中加入包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体,在25~37℃下振摇孵育2~4小时,制得羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳;

3) 根据所述试剂B的各组分浓度,向pH=6.5~7.3的MES缓冲液中加入表面活性剂、电解质和羊抗人补体C4多克隆抗体,然后加入步骤2)制得的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳;

4) 用0.2μL尼龙膜过滤除菌和大颗粒,得试剂B。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤1)中的羧基微球粒径为30~80nm优选40~50nm;NHS与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1,EDC与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1;步骤2)中,包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1。

9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤2)和步骤3)中加入的羊抗人补体C4多克隆抗体预先用pH=6.5~7.3的MES缓冲液稀释至20~30g/L。

10. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,步骤3)中,还添加有防腐剂proclin300和/或叠氮钠,所述防腐剂添加浓度为0.5~1g/L。

## 基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 补体C4是一种存在于血浆中的多功能 $\beta$ 1-球蛋白。在补体传统途径活化中,C4被C1s水解为C4a、C4b,它们在补体活化、促进吞噬、防止免疫复合物沉着和中和病毒等方面发挥作用。C4是补体经典激活途径的一个重要组分,它的测定有助于SLE等自身免疫性疾病诊断、治疗和病因探讨。比如C4的降低常见于免疫复合物引起的肾炎、系统性红斑狼疮、病毒性感染、狼疮性症候群、肝硬化、肝炎等,而升高常见于各种传染病、急性炎症、组织损伤、多发性骨髓瘤等。

[0003] 现有技术中检测补体C4的方法主要有免疫比浊法和放射免疫扩散法等,其中免疫比浊法是抗原抗体结合动态测定方法,操作相对简单、成本低,在生化分析仪上使用较为广泛。免疫比浊法可分为免疫透射比浊法和免疫散射比浊法。其基本原理是:当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中在 高分子促聚剂(聚乙二醇等)的作用下聚合析出直径为340nm~700nm的颗粒,使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。当入射光照射不同浊度的反应液时可被不同程度的吸收、反射和折射,通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可得出检样中抗原的含量。在普通的免疫透射比浊法或免疫散射比浊法中,少量的小的抗原抗体复合物极难形成浊度,除非放置较长时间,但检测的灵敏度会较低,而加大抗体抗原的用量又会增加检测成本,而且不符合微量化的要求。基于此,现有技术中公开有胶乳增强免疫比浊法即胶乳免疫比浊法,其原理是将与待测物质相对应的抗体包被在一定直径的胶乳颗粒上,使抗原抗体结合物的体积增大,光通过之后,透射光和散射光的强度变化更为显著,从而提高试验的灵敏度。

[0004] 但是在胶乳免疫比浊法中,添加的高分子促聚剂虽然可以使抗体更容易结合抗原,但是同时也会使抗体结合其他物质,导致非特异性增强;而且活化胶乳亦使得抗体本身的反应性显著增加,增多超量的高分子促聚剂,会使更多的胶乳聚集,进一步促进非特异性反应,结果容易导致聚集的胶乳颗粒粒径不均匀,反应重现性低,检测时的特征波长不固定。而在临床使用过程中,参数都是固定的,特征波长的变动使得该技术在 实际临床应用中有一定局限性,现有的测定补体C4的胶乳免疫比浊法用的试剂盒的检测限较高,对低浓度的样本的检测效果不理想。另外,现有的胶乳免疫比浊法所用的胶乳在制备过程中需要分离过量的EDC、NHS等活化试剂,而且需要进行封闭处理,操作上较为繁琐。

### 发明内容

[0005] 因此,针对现有技术中测定补体C4的试剂盒的容易出现非特异性反应,检测限较高的技术问题,本发明的目的在于提供一种可有效避免非特异性反应、检测灵敏度高、检测

限低的基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒。

[0006] 本发明的基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒包括：

[0007] 试剂A,所述试剂A为pH=8.0~9.4的甘氨酸缓冲体系,含有0.1~0.5g/L的高分子促聚剂、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质；

[0008] 以及试剂B,所述试剂B为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,含有1.5~2.0g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5~10mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质。

[0009] 所述胶乳为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,是粒径为30~80nm优选40~50nm的羧基微球经NHS(N-羟基丁二酰亚胺)和EDC(1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)活化后再由羊抗人补体C4多克隆抗体包被得到的乳胶；所述胶乳中,羧基微球的浓度为1~2g/L优选1g/L,NHS与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1,EDC与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1,包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1。

[0010] 优选的,所述试剂A和所述试剂B分别还含有0.5~1g/L的防腐剂,所述防腐剂为proclin300和/或叠氮钠。

[0011] 优选的,所述试剂A中的高分子促聚剂为聚乙二醇6000,聚乙二醇6000在所述试剂A中的浓度为0.2~0.5g/L;所述试剂A和所述试剂B中的表面活性剂均为曲拉通X100;所述试剂A和所述试剂B中的电解质均为氯化钠。

[0012] 本发明的一较佳实施例的所述试剂A为pH=8.6的100mmol/L甘氨酸缓冲体系,含有0.5g/L的聚乙二醇6000、1g/L的曲拉通X100、5g/L的氯化钠和1g/L的叠氮钠。

[0013] 本发明的一较佳实施例的所述试剂B为pH=6.8的50mmol/L MES缓冲体系,含有1.8g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1g/L的曲拉通X100、5g/L的氯化钠和1g/L的叠氮钠。

[0014] 本发明另一目的还在于公开一种制备试剂B的方法,所述试剂B为pH=6.5~7.3的MES缓冲体系,含有1.5~2.0g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5~10mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1~10g/L的表面活性剂和0.5~10g/L的电解质；

[0015] 该方法包括如下步骤：

[0016] 1)用pH=6.5~7.3的MES缓冲液将羧基微球稀释至1~2g/L,再加入NHS和EDC,15~25℃下反应20~30分钟得到活化胶乳；

[0017] 2)向活化胶乳中加入包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体,在25~37℃下振摇孵育2~4小时,制得羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳；

[0018] 3)根据所述试剂B的各组分浓度,向pH=6.5~7.3的MES缓冲液中加入表面活性剂、电解质和羊抗人补体C4多克隆抗体,然后加入步骤2)制得的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳；

[0019] 4)用0.2μL尼龙膜过滤除菌和大颗粒,得试剂B。

[0020] 步骤1)中的羧基微球粒径为30~80nm优选40~50nm;NHS与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1,EDC与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1;步骤2)中,包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体与羧基微球的质量比为0.05~0.1:1。

[0021] 步骤2)和步骤3)中加入的羊抗人补体C4多克隆抗体预先用pH=6.5~7.3的MES缓冲液稀释至20g/L。

[0022] 步骤3)中,还添加有防腐剂proclin300和/或叠氮钠,所述防腐剂添加浓度为0.5~1g/L。

[0023] 本发明的关键技术及积极进步效果在于:

[0024] 1、本发明的一关键技术是试剂B中控制羊抗人补体C4多克隆抗体与活化胶乳中的羧基微球的质量比例为100~200:1,同时羧基微球的粒径为30~80nm尤其是40~50nm,使少量包被用抗体与羧基微球结合,这样便形成了普通抗体和携带羧基微球的包被抗体的混合物,而且通过0.2 $\mu$ L膜过滤去除聚集的微球。当加入抗原时,抗原就会按照比例与这两种抗体结合,聚集形成的颗粒物就会包含1个或几个羧基微球,反应的性能大大增加,尽可能避免非特异性反应。

[0025] 2、本发明另一关键技术是高分子促聚剂的用量,浓度为0.1~0.5g/L。本发明由于加入了含有羧基微球的活化胶乳,抗体的反应性显著增加,但是若按现有技术中为促进免疫复合物聚集而添加过量的高分子促聚剂,反倒会使更多的羧基微球聚集,产生非特异性反应。本发明试图调整高分子促聚剂的用量以尽可能的避免非特异性反应,由于含有活化的羧基微球,反应本身具有一定的灵敏度,所以考虑较少的高分子促聚剂是否就能具有较好的促聚作用。实验的实际结果也确实如此,当高分子促聚剂的用量降低至浓度为0.1~0.5g/L时可达到较佳的效果。

[0026] 3、本发明还有一关键技术涉及所述试剂B的制备过程,首先胶乳中的羧基微球经NHS、EDC活化后与包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体混合孵育,然后与其余组分混合,配制成试剂B。与传统的胶乳制备过程相比,控制NHS、EDC以及包被用的羊抗人补体C4多克隆抗体的用量,可避免NHS、EDC与活化羧基微球分离过程,以及活化羧基微球封闭过程,因此操作上更加简化。

[0027] 综上,本发明的所述试剂盒可用于全自动生化分析仪上检测人血清补体C4的含量,与现有的免疫比浊试剂相比,可有效避免非特异性反应,特征吸收波长稳定,可提高反应灵敏度,检测限较低,可用于较低浓度样本的检测,而且与传统的胶乳制备过程相比,本发明免去了较多的液固分离和封闭过程,操作上更加简化。

## 附图说明

[0028] 图1为补体C4标准血清样本的浓度及 $\Delta A$ 值的对应散点图。

## 具体实施方式

[0029] 实施例1~3试剂盒及其制备

[0030] 试剂盒可用于胶乳免疫比浊法测定补体C4,包括试剂A和试剂B。

[0031] 试剂A的组分如表1所示。

[0032] 表1试剂A的组分

	组分	实施例 1	实施例 2	实施例 3
[0033]	甘氨酸缓冲体系 pH	9.44	8.02	8.58
	聚乙二醇 6000 (g/L)	0.1	0.5	0.3
	曲拉通 X100 (g/L)	1.0	1.0	5.0
[0034]	氯化钠 (g/L)	0.5	0.1	5.0
	叠氮钠 (g/L)	0.5	1.0	1.0

[0035] 试剂A的配制步骤为(配制1L):分别按照表1中实施例1~3的组分浓度,取甘氨酸(7.5g,100mmol)溶于纯化水(1L)中,然后加入对应量的氯化钠、曲拉通X100、聚乙二醇6000和叠氮钠,混匀并用氢氧化钠调节pH得到试剂A。

[0036] (2)试剂B的组分如表2所示。

[0037] 表2试剂B的组分

	组分	实施例 1	实施例 2	实施例 3
[0038]	MES 缓冲体系 pH	6.8	6.8	6.8
	曲拉通 X100 (g/L)	1.0	10	5.0
	氯化钠 (g/L)	0.5	10	5.0
	叠氮钠 (g/L)	1.0	1.0	1.0
	羊抗人补体 C4 多克隆抗体 (g/L)	2.0	1.5	1.7
	胶乳 (mL/L)	10	10	10

[0039] 表2中的胶乳为含有1g/L的羧基微球的MES缓冲体系,胶乳中的羧基微球经NHS和EDC活化并由羊抗人补体C4多克隆抗体包被,实施例1~3的胶乳中的NHS、EDC和羊抗人补体C4多克隆抗体与羧基微球质量比如表3所示。

[0040] 表3胶乳中的各组分与羧基微球的质量比

	组分	实施例 1	实施例 2	实施例 3
[0041]	NHS	0.05	0.75	0.1
	EDC	0.05	0.75	0.1
	包被用的羊抗人补体 C4 多克隆抗体	0.05	0.75	0.10

[0042] 试剂B的配制步骤为(配制1L):

[0043] 1)取100 $\mu$ L固体含量为10g/100mL的羧基微球(由Bangs laboratories, Inc提供),用MES缓冲液(50mmol/L, pH=6.8, 下同)稀释至10mL,然后加入表3所示比例对应量的NHS和

EDC,室温反应20分钟得到活化胶乳。

[0044] 2)向活化胶乳中加入表3所示比例对应体积的含30g/L羊抗人补体C4多克隆抗体的MES缓冲液,然后在37℃下振摇孵育2小时制得羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳,即表2中所述的胶乳。

[0045] 3)向500mL的MES缓冲液中加入表2所示比例对应量的氯化钠、曲拉通X100、叠氮钠和表2所示比例对应体积的含30g/L羊抗人补体C4多克隆抗体的MES缓冲液,然后加入步骤2)制得的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的10mL胶乳,并用MES缓冲液补足至1L。

[0046] 4)混匀后用0.22μL的尼龙膜过滤,除菌和除大颗粒得到试剂B。

[0047] 效果实施例1

[0048] 效果测试试剂盒:实施例1~3的试剂盒、对比例的补体C4试剂盒(由四川新健康成生物股份有限公司生产)。

[0049] 仪器:日立7170生化分析仪。

[0050] 测试波长:主波长340nm,副波长700nm。

[0051] 测试方法:终点法,递增性反应。37℃条件下,首先试剂A与补体C4的血清样本混匀3~5分钟,然后加入试剂B开始反应,其中体积比试剂A:试剂B:样本=200:40:2;5分钟时比照空白测定初始吸光度A<sub>1</sub>,然后在10分钟时比照空白测定吸光度A<sub>2</sub>,计算A<sub>2</sub>与A<sub>1</sub>的差值ΔA。

[0052] 1、标准曲线的测定

[0053] 以实施例1~3和对比例的试剂盒分别逐一测定如表4所示的一系列标准浓度的补体C4的标准血清样本的ΔA值,而根据一系列补体C4的浓度和测得的ΔA值可分别拟合出各试剂盒的标准曲线,标准曲线为LOG1T-LOG4P函数。

[0054] 补体C4的浓度与测定ΔA值的对应的散点图如图1所示,由图1可知,实施例1~3相比于对比例,补体C4的浓度与ΔA值的线性关系更好,拟合的标准曲线的斜率将更大,准确度和灵敏度都有较大的提升。

[0055] 表4标准血清样本的ΔA值测试结果

	标准浓度 mg/dL	实施例 1 ΔA	实施例 2 ΔA	实施例 3 ΔA	对比例 ΔA
[0056]	60.6	8959	9342	9660	6760
	30.3	5130	5272	5057	3976
	15.2	2715	2700	2714	2422
[0057]	7.6	1338	1369	1361	1427
	0	306	249	254	253

[0058] 2、标准曲线的检测效果

[0059] 以实施例1~3和对比例的试剂盒分别测定的表5所示一系列含有已知浓度补体C4的血清样本的ΔA值,然后在拟合的标准曲线上分别得出对应的测定浓度,该测定浓度和实

际浓度会出现偏差,如表5所示。

[0060] 表5测定结果对比

[0061]

实际浓度 (mg/dL)	实施例 1		实施例 2		实施例 3		对比例	
	测定浓度	偏差	测定浓度	偏差	测定浓度	偏差	测定浓度	偏差
105.0	104.6	-0.36%	104.8	-0.22%	104.6	-0.36%	106.6	1.49%
52.5	51.6	-1.78%	51.0	-2.92%	52.9	0.77%	51.4	-2.10%
26.3	26.4	0.49%	25.8	-1.78%	26.4	0.49%	26.6	1.20%
13.1	12.8	-2.35%	13.1	-0.08%	12.8	-2.35%	13.4	2.36%
6.6	6.3	-4.62%	6.7	2.19%	6.3	-4.62%	6.3	-4.62%
3.3	3.4	4.46%	3.4	4.46%	3.0	-9.16%	3.7	12.76%
1.6	1.9	15.81%	1.8	9.01%	1.6	-0.08%	2.2	34.10%

[0062] 临床准确度要求偏差不超过10%。通过表5可知,对比例的试剂盒在检测3.3mg/dL的样本时偏差就超过了临床要求的10%,其检测限只能是6.6mg/dL。而本发明的试剂盒在检测3.3mg/dL样本所得结果与实际浓度偏差在10%以内,符合临床准确度要求,因此最低检测限可以达到3.3mg/dL。

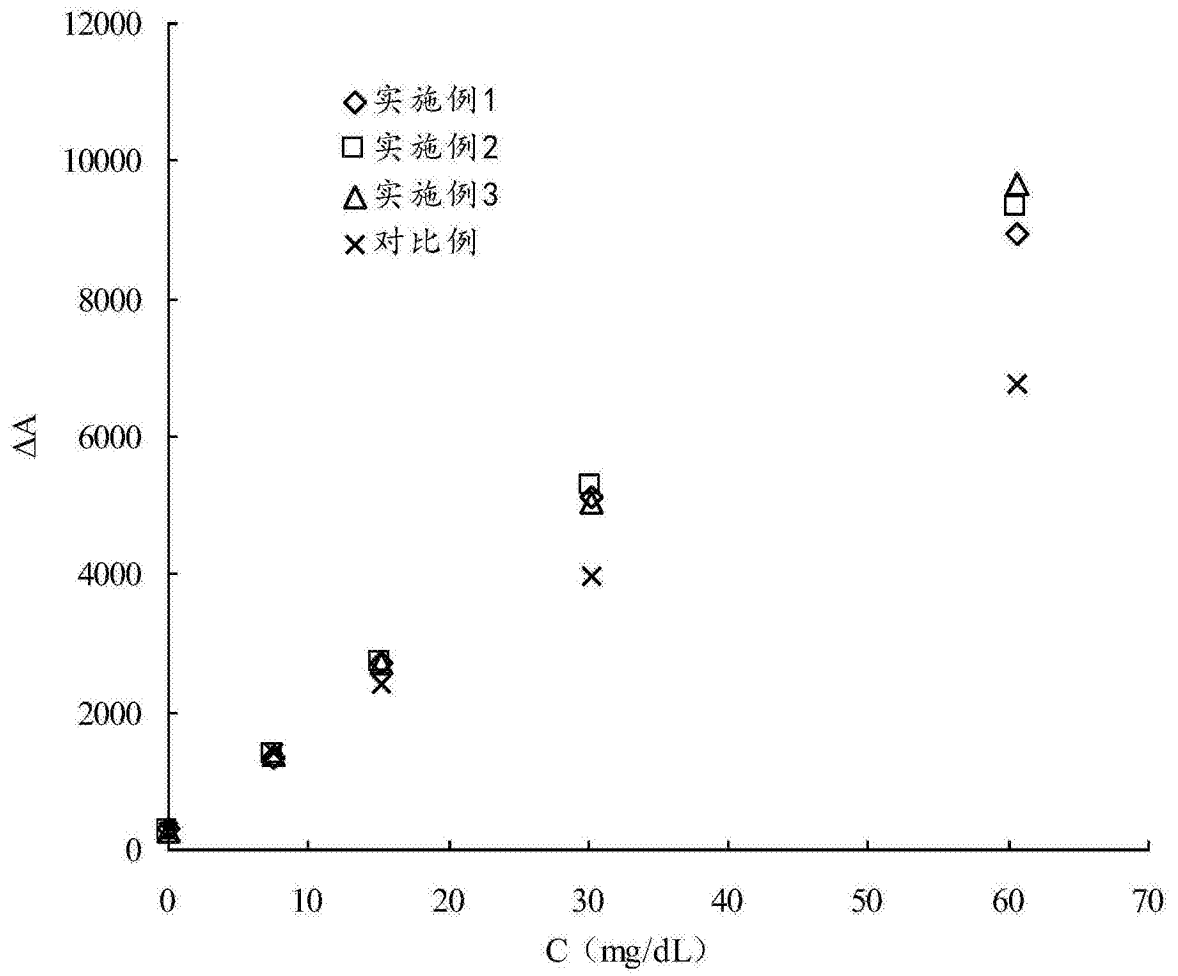


图1

专利名称(译)	基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106124774A</a>	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201610431512.2	申请日	2016-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海执诚生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海执诚生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海执诚生物科技有限公司		
[标]发明人	王军峰 王咏 孟菲		
发明人	王军峰 王咏 孟菲		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/544 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/544 G01N33/6893		
代理人(译)	刘秋兰		
其他公开文献	CN106124774B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于胶乳免疫比浊法的补体C4试剂盒，其包括：试剂A，所述试剂A为pH = 8.0 ~ 9.4的甘氨酸缓冲体系，含有0.1 ~ 0.5g/L的高分子促聚剂、1 ~ 10g/L的表面活性剂和0.5 ~ 10g/L的电解质；以及试剂B，所述试剂B为pH = 6.5 ~ 7.3的MES缓冲体系，含有1.5 ~ 2g/L的羊抗人补体C4多克隆抗体、5 ~ 10mL/L的羊抗人补体C4多克隆抗体包被的胶乳、1 ~ 10g/L的表面活性剂和0.5 ~ 10g/L的电解质。本发明还公开了制备试剂B的方法。所述试剂盒可用于人补体C4的测定，可有效避免非特异性反应，检测灵敏度较高，且具有较低的检测限。

组分	实施例1	实施例2	实施例3
甘氨酸缓冲体系 pH	9.44	8.02	8.58
聚乙二醇 6000 (g/L)	0.1	0.5	0.3
曲拉通 X100 (g/L)	1.0	1.0	5.0