



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107192821 B

(45)授权公告日 2019.08.09

(21)申请号 201710325483.6

C12Q 1/04(2006.01)

(22)申请日 2017.05.10

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107192821 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2017.09.22

CN 102662059 A,2012.09.12,

CN 102662059 A,2012.09.12,

(73)专利权人 北京万泰德瑞诊断技术有限公司

CN 104535761 A,2015.04.22,

地址 102206 北京市昌平区科学园路31号

CN 102854314 A,2013.01.02,

(72)发明人 李雪 潘玥 许泼实

CN 102515236 A,2012.06.27,

WO 2015151128 A1,2015.10.08,

(51)Int.Cl.

ES 2527887 A1,2015.02.02,

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/82(2006.01)

C12Q 1/689(2018.01)

审查员 舒霏霏

权利要求书2页 说明书25页 附图5页

(54)发明名称

一种提高幽门螺杆菌致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊测定试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种提高幽门致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊试剂盒,该试剂盒由分别放置的试剂1,试剂2、校准品、低值质控品和高值质控品组成。通过前期对幽门螺杆菌菌株进行分型鉴定,提高了致病性菌株的检出率;抗原包被过程中选用4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)作为超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球与抗原结合的交联剂,在增加偶联效率的同时利用超支化聚缩水甘油醚的亲水特性保护偶联抗原构象,提高抗原抗体特异性结合;试剂配制过程中选择了一种新型的表面活性剂十二烷基葡萄糖苷,在与其他活性剂、稳定剂、保护剂及防腐剂的共同作用下,有效提高了试剂脂类杂质及杂质蛋白清除能力。

CN 107192821 B

1. 一种提高幽门致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊试剂盒, 包含试剂1、试剂2、校准品、低值质控品和高值质控品, 其各组分及浓度范围为:

试剂1:

Tris-HCl缓冲液	50mmol/L
氯化钠	0.8%~0.9%
BSA	0.5%~1%
TRITON X-100	0.1%~0.5%
十二烷基葡萄糖苷	0.01%~0.05%
蔗糖	2%~5%
Proclin300	0.05%

pH为7.4~8.4,

试剂2:

特异性东亚幽门螺杆菌抗原包被的改性胶乳微粒	3mg/mL~5mg/mL
磷酸缓冲液	10mmol/L
BSA	0.5%~1%
甘油	2%~3%
十二烷基葡萄糖苷	0.01%~0.05%
Proclin300	0.05%

pH为6.5~7.5,

校准品:

磷酸缓冲液	10mmol/L
特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体	水平1: 0mg/mL、 水平2: 0.04mg/mL~0.06mg/mL、 水平3: 0.16mg/mL~0.24mg/mL、 水平4: 0.48mg/mL~0.72mg/mL、 水平5: 0.96mg/mL~1.44mg/mL、 水平6: 1.92mg/mL~2.88mg/mL
人血清	5%
Proclin300	0.05%
十二烷基葡萄糖苷	0.01%
甘油	5%

低值/高值质控品:

磷酸缓冲液	10mmol/L
特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体	低值: 0.08mg/mL~0.12mg/mL, 高值:0.72mg/mL~1.08mg/mL
人血清	5%
Proclin300	0.05%
十二烷基葡萄糖苷	0.01%
甘油	5%

所述特异性东亚幽门螺杆菌抗原包括东亚幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原;

所述改性胶乳颗粒为超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶,由粒径为50nm~80nm和粒径为250nm~300nm两种微粒组成。

2.如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的东亚幽门螺杆菌抗原是由如下步骤制备而成:

- 1)从幽门螺杆菌患者中分离出幽门螺杆菌;
- 2)对分离出的幽门螺杆菌做CagA和VacA的PCR并测序;
- 3)根据测序结果筛选出东亚菌株;
- 4)对东亚菌株进行扩大培养;
- 5)细胞破碎,离心,提取上清,纯化及蛋白浓度测定。

3.如权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于所述特异性东亚幽门螺杆菌抗原包被的改性胶乳颗粒制备方法如下:

1)胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于吡啶中,用丁二酸酐(Suc)进行修饰得到含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚;

2)胶乳颗粒标记:用含1%甘油,0.01%十二烷基葡萄糖苷的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液将胶乳颗粒稀释成5mg/mL,按与超支化聚缩水甘油醚微球所含羧基的摩尔比1:3~5的比例加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM),混匀活化5-10min;按与超支化聚缩水甘油醚羧基微球质量比:1:30~60加入待偶联抗原,37℃摇床孕育1h~3h;加入含有0.5%BSA,0.01%十二烷基葡萄糖苷,5%甘油及0.05%Proclin300的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液,37℃摇床封闭1h~3h;0.22μm滤膜过滤;将标记完成的乳胶颗粒分装成1mL/支,4℃保存;

3)使用上述步骤分别对粒径为50nm~80nm和粒径为250nm~300nm的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶进行标记;将标记后的胶乳进行混合,按质量体积百分比计,粒径为50nm~80nm的胶乳浓度为0.65%~0.85%,粒径为250nm~300nm的胶乳浓度为0.15%~0.35%,混合,4℃保存。

一种提高幽门螺杆菌致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属医学检验技术领域,涉及一种提高幽门螺杆菌致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊测定试剂盒。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,简称H.pylori)是一种单极,多鞭毛、末端钝圆、螺旋形弯曲的细菌,呈格兰染色阴性,在胃粘膜上皮细胞表面常呈典型的螺旋状或弧形。

[0003] 幽门螺杆菌是胃癌高危因子之一。1994年世界卫生组织/国际癌症研究机构(WHO/IARC)将其定为I类致癌原。流行病学显示,全球几乎有一半的人口感染此菌,发展中国家甚至高达60%~70%。因此,幽门螺杆菌感染是世界各国需要面对的公共卫生问题。

[0004] 幽门螺杆菌主要分为两种亚型,其中I型表达VacA,CagA等基因,被认为是导致胃部疾病的主要类型。而I型中的东亚型(EAS)导致胃癌的比例更高,相比未感染人群,发病率可高出20倍。

[0005] 目前幽门螺杆菌从检测手段上分为侵入性和非侵入性两大类。

[0006] 侵入法虽然检测准确,但此项检测一般需要进入病人胃部,给患者带来较大痛苦;且该类方法操作复杂,检测周期较长,不利于疾病的快速诊断;因此不适用于幽门螺杆菌的早期诊断与治疗。

[0007] 非侵入性检测避免了因反复做胃镜带来的痛苦或发生的其它类型的感染,试验方法主要有尿素呼吸试验和血清学法。尿素呼吸试验虽然灵敏度高,且可实现定量测定,但有一定的放射危害,且检测费用昂贵。血清学法中的酶联免疫、免疫印迹法和胶体金法虽提供了便捷手段,但检测速度慢且不利于大批量检测。胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌不仅简便、快速、可实现批量检测,而且是定量检测的血清学法,由于该方法在幽门螺杆菌检测中的诸多优点,引发了国内广泛的研究热潮,目前国内已公布的发明专利如下:

申请人	专利名称	技术平台	发明点	技术特点	专利号
[0008] 深圳市亚辉龙生物科技有限公司	一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其检测方法	胶乳免疫比浊法	1)幽门螺杆菌特异性抗原包括:幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原,幽门螺杆菌尿素酶抗原,幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A或幽门螺杆菌细胞空泡毒素A抗原; 2)选用的胶乳粒径为	1) 定量检测,灵敏度高,可达到2.0AU/mL,线性范围可达到(5~180)AU/mL; 2)稳定性2-8度贮存12个月	201110219417.3

			50-150nm			
[0009]	深圳康美生物科技股份有限公司	一种胶乳免疫比浊法进行幽门螺杆菌抗体检测的试剂盒	胶乳免疫比浊法	1) 幽门螺杆菌基因重组抗原, 单一抗原; 2) 胶乳微粒选用90nm-300nm一种粒径的聚苯乙烯微球; 3) 选用EDC对胶乳微粒进行活化	1) 定量检测, 灵敏度高, 可达到3.0AU/mL, 线性范围可达到185AU/mL; 2) 稳定性2-8度贮存16个月。	201210382 122.2
	北京美康生物技术研究中心	一种用于测定幽门螺杆菌抗体的胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用	胶乳免疫比浊法	1) 幽门螺杆菌特异性抗原包括: 幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原, 幽门螺杆菌尿素酶抗原, 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A或幽门螺杆菌细胞空泡毒素A抗原的一种或多种; 2) 胶乳微粒选用粒径为60nm-90nm和粒径为160nm-200nm两种聚苯乙烯微球; 3) 选用EDC对胶乳微粒进行活化	1) 定量检测, 灵敏度高, 可达到2.0AU/mL, 线性范围可达到245AU/mL; 2) 稳定性2-8度贮存12个月。	201210147 411.4

[0010] 但该方法目前仍存在以下技术缺陷: 1) 与临床通用诊断标准比较敏感度, 特异性及精确度较低; 2) 交联剂及胶乳微球在抗原交联过程中的稳定性、特异性及偶联效率仍有待改进; 3) 试剂中保护剂、稳定剂及表面活性剂的选用、配比及与微球的协同作用直接影响检测的试剂的灵敏度, 线性, 特异性及试剂稳定性; 为便于临床推广及确保检测结果的可信度, 需要进一步提高现有技术的灵敏度, 线性, 特异性及稳定性。

发明内容

[0011] 本发明为了克服上述现有技术缺陷, 提供了一种高幽门螺杆菌致病菌抗体检出率, 特异性强, 稳定性好, 灵敏度高, 线性范围广的幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒, 以及试剂盒的制备方法。

[0012] 本发明采取的技术方案是: 通过将前期分型的东亚幽门螺杆菌菌株抗原结合于改性后的胶乳颗粒上提高血清中的幽门致病菌抗体检测率及抗原抗体结合的特异性。

[0013] 本发明是通过以下措施实现的:

[0014] 幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒, 包含试剂1、试剂2、校准品、低值质控品和

高值质控品;其各组分及浓度范围为:

[0015]	试剂1:	
	Tris-HCl缓冲液	50mmol/L
	氯化钠	0.8%~0.9%
	BSA	0.5%~1%
[0016]	TRITON X-100	0.1%~0.5%
	十二烷基葡萄糖苷	0.01%~0.05%
	蔗糖	2%~5%
	Proclin300	0.05%
	pH为 7.4~8.4,	
[0017]	试剂2:	
	特异性东亚幽门螺杆菌抗原包被的改性胶乳微粒	3mg/mL~5mg/mL
	磷酸缓冲液	10mmol/L
	BSA	0.5%~1%
[0018]	甘油	2%~3%
	十二烷基葡萄糖苷	0.01%~0.05%
	Proclin300	0.05%
	pH为 6.5~7.5,	
[0019]	校准品:	
[0020]		
	磷酸缓冲液 (7.3±0.05)	10mmol/L
	特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体 (纯度≥95%)	水平1: 0mg/mL、 水平2: 0.04mg/mL~0.06mg/mL、 水平3: 0.16mg/mL~0.24mg/mL、 水平4: 0.48mg/mL~0.72mg/mL、 水平5: 0.96mg/mL~1.44mg/mL、 水平6: 1.92mg/mL~2.88mg/mL
	人血清	5%
	Proclin300	0.05%
	十二烷基葡萄糖苷	0.01%
	甘油	5%
[0021]	低值/高值质控品:	
[0022]		
	磷酸缓冲液(7.3±0.05)	10mmol/L
	特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体 (纯度≥95%)	低值: 0.08mg/mL~0.12mg/mL,

[0023]

	高值:0.72mg/mL~1.08mg/mL
人血清	5%
Proclin300	0.05%
十二烷基葡萄糖苷	0.01%
甘油	5%

[0024] 所述特异性东亚幽门螺杆菌抗原为东亚幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原。

[0025] 所述改性胶乳颗粒为超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶,由粒径为50nm~80nm 和粒径为250nm~300nm两种微粒组成。基蛋生物科技股份有限公司在其发明专利“超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法及其应用”中公开了一种超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶的制备及其在胶乳增强免疫比浊法中的应用;该发明采用的聚缩水甘油醚的活化相对复杂,且其采用单粒径胶乳微粒,无法同时满足试剂对灵敏度及线性的较高需求。本发明首次将该胶乳微粒运用于幽门螺杆菌测试中,且采用丁二酸酐(Suc)进行修饰得到含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚。操作相对简单,易于控制。由于本发明对线性及灵敏度的较高需求,本发明经过反复探索选用粒径为50nm~80nm和粒径为250nm~300nm两种微粒。

[0026] 本发明所述东亚幽门螺杆菌抗原的制备包括如下步骤:

- [0027] 1) 从幽门螺杆菌患者中分离出幽门螺杆菌;
- [0028] 2) 对分离出的幽门螺杆菌做CagA和VacA的PCR并测序;
- [0029] 3) 根据测序结果筛选出东亚菌株;
- [0030] 4) 对东亚菌株进行扩大培养;
- [0031] 5) 细胞破碎,离心,提取上清,纯化及蛋白浓度测定。

[0032] 在具体实施例中,公开了一种制备东亚幽门螺杆菌抗原的方法。

[0033] 本发明中,所述特异性东亚幽门螺杆菌抗原包被的胶乳颗粒制备方法如下:

[0034] 1) 胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于吡啶中,用丁二酸酐(Suc)进行修饰得到含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚。

[0035] 2) 胶乳颗粒标记:用含1%甘油,0.01%十二烷基葡萄糖苷的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液将胶乳颗粒稀释成5mg/mL,按与超支化聚缩水甘油醚微球所含羧基的摩尔比1:3~5的比例加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM),混匀活化5-10min;按与超支化聚缩水甘油醚羧基微球质量比:1:30~60加入待偶联抗原,37℃摇床孕育1h~3h;加入含有0.5%BSA,0.01%十二烷基葡萄糖苷,5%甘油及0.05%Proclin300的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液,37℃摇床封闭1h~3h;0.22μm滤膜过滤;将标记完成的乳胶颗粒分装成1mL/支,4℃保存。

[0036] 3) 使用上述步骤分别对粒径为50nm~80nm和粒径为250nm~300nm的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶进行标记;将标记后的胶乳进行混合,按质量体积百分比计,粒径为50nm~80nm的胶乳浓度为0.65%~0.85%,粒径为250nm~300nm的胶乳浓度为0.15%~0.35%,混合,4℃保存。

[0037] 本发明中所述的百分比浓度,如未进行特殊说明,均为质量体积百分比浓度,即

100mL 溶液中所含溶质的克数。

[0038] 本发明的有益效果：

[0039] 1) 本发明前期对菌株进行分型鉴定, 选用东亚幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原, 由于患者感染幽门螺杆菌后血清中会产生相应抗体, 而且所感染的幽门螺杆菌类型不同, 产生的抗体类型也不同; 本发明通过前期分离制备致病东亚幽门螺杆菌菌株抗原的方法进而提高产品对致病菌感染人血清的敏感度; 同时由于幽门螺杆菌本身变异较大, 选用全菌体蛋白亦可避免因一种蛋白变异而造成的特异度降低。

[0040] 2) 本发明选用两种粒径的超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球, 在增加试剂线性及灵敏度的同时, 利用超支化聚缩水甘油醚的亲水特性保护偶联抗原构象, 提高抗原抗体特异性结合, 同时通过稳定剂, 保护剂与超支化聚缩水甘油醚的协同作用, 增加了乳胶微粒的稳定性及抗原与微粒结合的稳定性及特异性

[0041] 3) 胶乳颗粒标记过程中: 选用含1%甘油, 0.01%十二烷基葡萄糖苷的磷酸缓冲液稀释胶乳颗粒增加了胶乳颗粒的均匀度, 避免胶乳颗粒自身的凝聚, 缩短了后续的活化时间, 同时改善了胶乳颗粒的包被量; 选用4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM) 作为微球与抗原的交联剂, DMTMM与甘油及十二烷基葡萄糖苷的协同作用增加了抗原与微粒的偶联效率, 提高了微粒包被的均一性; 选用含有0.5%BSA, 0.01%十二烷基葡萄糖苷, 5%甘油的磷酸缓冲液作为封闭液, 减少了非特异性蛋白的交联, 提高了抗原与微球结合的稳定性及特异性; 该标记过程相对简单易于操作, 确保了抗原标记的特异性、稳定性及均一性。

[0042] 4) 通过大量实验筛选尝试, 选择了一种新型的表面活性剂十二烷基葡萄糖苷; 该活性剂与TRITON X-100协同作用, 提高了脂类杂质清除的效力, 减少了脂类杂质的干扰; 同时提高了稳定剂BSA的稳定性, 在原来基础上大大提高了BSA特异性吸附杂质蛋白的能力, 减少了杂质蛋白与幽门螺杆菌抗原的非特异性结合, 保持了幽门螺杆菌抗原的天然构象; 与保护剂蔗糖及甘油的协同作用有效提高抗体及胶乳颗粒在溶液中的分散性及稳定性。同时十二烷基葡萄糖苷还具有杀菌特性, 与Procline300的协调作用下, 有效延长了试剂盒效期, 本发明试剂盒在2℃~8℃温度条件下贮存, 至少稳定20个月。

[0043] 5) 通过各组分配比的选择调试, 最终将临床诊断的敏感度, 特异性及精确度提高到了90%以上。

附图说明

[0044] 图1为采用本发明实施例1制备的6个不同梯度, 0AU/mL、4AU/mL、16AU/mL、48AU/mL、96AU/mL、192AU/mL (浓度分别为0mg/mL、0.04mg/mL、0.16mg/mL、0.48mg/mL、0.96mg/mL、1.92mg/mL) 的东亚幽门螺杆菌校准品, 在日立7080全自动生化分析仪上, 绘制出本发明校准品的标准曲线。其中X轴表示东亚幽门螺杆菌抗体的含量(AU/mL); Y轴表示吸光度。

[0045] 图2为实施例1对照试剂盒线性范围相关性示意图, 图3为实施例1发明试剂盒线性范围相关性示意图。

[0046] 图4为采用本发明实施例2制备的6个不同梯度, 0AU/mL、5AU/mL、20AU/mL、60AU/mL、120AU/mL、240AU/mL (浓度分别为0mg/mL、0.05mg/mL、0.2mg/mL、0.6mg/mL、1.2mg/mL、2.4mg/mL) 的东亚幽门螺杆菌校准品, 在日立7080全自动生化分析仪上, 绘制出本发明校准

品的标准曲线。其中X轴表示东亚幽门螺杆菌抗体的含量(AU/mL);Y轴表示吸光度。

[0047] 图5为实施例2对照试剂盒线性范围相关性示意图,图6为实施例2发明试剂盒线性范围相关性示意图。

[0048] 图7为采用本发明实施例3制备的6个不同梯度,0AU/mL、6AU/mL、24AU/mL、72AU/mL、144AU/mL、288AU/mL(浓度分别为0mg/mL、0.06mg/mL、0.24mg/mL、0.72mg/mL、1.44mg/mL、2.88mg/mL)的东亚幽门螺杆菌校准品,在日立7080全自动生化分析仪上,绘制出本发明校准品的标准曲线。其中X轴表示东亚幽门螺杆菌抗体的含量(AU/mL);Y轴表示吸光度。

[0049] 图8为实施例3对照试剂盒线性范围相关性示意图,图9为实施例3发明试剂盒线性范围相关性示意图。

具体实施方式

[0050] 实施例对本发明作进一步描述,但是,本申请不限于这些实施例,这些实施例也不能解释为对本申请的限制。下述试剂的配制方法如无特别说明,均为常规方法,所使用的试验材料如无特别说明,均可从商业公司获取。

[0051] 实施例1

[0052] 一、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的制备

[0053] 东亚幽门螺杆菌抗原的制备

[0054] 1)胃幽门螺杆菌的分离培养与鉴定:通过胃镜咬检幽门螺杆菌感染者的胃粘膜组织,然后将胃粘膜组织置于含有0.5mL布氏肉汤的玻璃研磨器中研磨成浆,吸取100 μ L涂布于歌伦比亚选择培养基平板上(含8%的脱纤维羊血,5mg/LTMP,5mg/L多粘菌素B,5mg/L两性霉素B,10mg/L万古霉素),然后把平板放置于三气培养箱中培养(10%CO₂,85%N₂,5%O₂)37 $^{\circ}$ C培养3~7天,对培养出的可疑菌落进行革兰染色镜检、脲素酶、触酶、氧化酶实验,结果是革兰阴性、S型或弧型,三酶实验阳性可初步鉴定为幽门螺杆菌(一部分菌株留种,另一部分进一步做PCR验证)。

[0055] 2)对分离出的幽门螺杆菌做CagA和VacA的PCR并测序;PCR方法如下(PCR的引物及其反应条件见表1):

[0056] a)细菌DNA的提取方法,按DNA提取试剂盒说明操作。

[0057] b)PCR的引物及其反应条件见表1。

[0058] 表格1 PCR引物和反应条件

[0059]

基因名称	CagA		VacAs1a	
引物	AAAGGAGT GGGCGGTTT	CCTGCTTGATT TGCCTCATCA	GTCAGCATCA CACCGCAAC	CTGCTTGAAT GCGCCAAC
产物长度 (bp)	92		190	
预变性℃(min)	95(10)		--	
变性℃ (min)	95(0.25)		94(1)	
退火℃ (min)	60(1)		52(1)	
延伸℃ (min)	72(0.5)		72(1)	
循环次数	50		35	
最后延伸℃	72(7)		72(5)	
参考文献	谢国艳 等 2012		Erzin et al 2006	

[0060] 3) 根据测序结果筛选出东亚菌株:对幽门螺杆菌毒力基因CagA和VacA测序完成后,根据基因组合,筛选出东亚菌株。

[0061] 4) 对东亚菌株进行扩大培养,接种于盛有500mL含10%的新生小牛血清的BHI培养的锥形瓶中,将锥形瓶瓶口以棉签覆盖紧(全程无菌操作避免杂菌污染),置于10%CO₂, 85%N₂, 5%O₂的环境条件下,37℃培养3~7天。

[0062] 5) 细胞破碎,离心,提取上清,纯化及蛋白浓度测定:

[0063] a) 取250mL幽门螺杆菌菌液,于8000r/min离心15min,弃上清,沉淀加入10mL 10mmol/L pH 7.4冷PBS缓冲液清洗,于8000r/min离心15min,沉淀加入10mL 10mmol/L pH 7.4PBS缓冲液混合均匀,超声破菌,于8000r/min离心15min,取出上清液并将其放置80℃备用。采用硫酸铵沉淀及SephadexTMG-25凝胶过滤法纯化蛋白。

[0064] b) 抗原蛋白浓度测定;以BCA蛋白浓度测定试剂盒定量幽门螺杆菌抗原蛋白浓度,蛋白浓度应 \geq 95%。

[0065] 试剂1的制备:在50mmol/L的Tris-HCl缓冲液中,添加0.9%氯化钠,1%BSA, 0.25%TRITON X-100,4%蔗糖,0.025%十二烷基葡萄糖苷,0.05%Proclin300,每种原料添加后均应搅拌均匀,直至原料添加结束后继续搅拌5min,静置2min,调pH至7.4,即得到试剂 1。

[0066] 试剂2的制备:

[0067] 1) 胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于吡啶中,用丁二酸酐(Suc)进行修饰得到含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚。

[0068] 2) 胶乳颗粒标记:用含1%甘油,0.01%十二烷基葡萄糖苷的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液将胶乳颗粒稀释成5mg/mL,按与超支化聚缩水甘油醚微球所含羧基的摩尔比1:3的比例加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM),混匀活化5min;按与超支化聚缩水甘油醚羧基微球质量比:1:60加入待偶联抗原,37℃摇床孕育3h;加入含有0.5%BSA,0.01%十二烷基葡萄糖苷,5%甘油及0.05%Proclin300的10mmol/LpH7.4磷酸

缓冲液,37℃摇床封闭1.5h;0.22μm滤膜过滤;将标记完成的乳胶颗粒分装成1mL/支,4℃保存。

[0069] 3) 使用上述步骤分别对粒径为50nm和粒径为300nm的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶进行标记,标记结束后,将所述50nm胶乳和所述300nm胶乳,按质量体积百分比计,粒径为50nm的胶乳浓度为0.75%,粒径为300nm的胶乳浓度为0.15%。

[0070] 4) 标记效率:使用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测抗原标记剩余上清液中抗原浓度,标记效率=(标记总蛋白量-上清液中蛋白量)/标记总蛋白量*100%

[0071] 5) 抗原浓度的确定:根据抗原过剩原则。确定最适宜的抗原浓度,选取线性最优;用含有0.5%BSA,2%甘油,0.025%十二烷基葡萄糖苷及0.05%Proclin300的10mmol/L pH7.35±0.05磷酸缓冲液,稀释抗原浓度至3mg/mL,即得到试剂2。

[0072] 校准品,低值质控品和高值质控品的制备:在10mmol/L, pH 7.3±0.05磷酸缓冲液中,添加5%人血清、0.05%Proclin300、5%甘油、0.01%十二烷基葡萄糖苷及特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体,其纯度≥95%,使校准品的最终浓度分别为1.92mg/mL、0.96mg/mL、0.48mg/mL、0.16mg/mL、0.04mg/mL、0mg/mL(转化为活性单位分别为192AU/mL、96AU/mL、48AU/mL、16AU/mL、4AU/mL、0AU/mL),高值质控品的最终浓度为0.72mg/mL(72AU/mL),低值质控品的最终浓度为0.08mg/mL(8AU/mL)。

[0073] 二、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒检测样本的方法

[0074] 检测方法及实验参数如下:

[0075] 分析方法:终点法(上升)

[0076] 试剂的用量:试剂1和试剂2用量分别为180μL和30μL;

[0077] 样本用量:6μL

[0078] 检测波长:565nm(700nm)

[0079] 检测步骤:180μL试剂1加入6μL样本,于37℃3min后加入30μL试剂2后开始读点,反应4min后读取另一点,得到的吸光度的差值。

[0080] 绘制本实施例制备的幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒校准品的标准曲线:

[0081] 采用本实施例制备的6种不同含量的东亚幽门螺杆菌校准品,在日立7080全自动生化分析仪上,按照上述检测步骤测得本发明校准品的标准曲线(如图1所示)。图1中曲线上的每个点代表一个含量的校准品。其中X轴表示东亚幽门螺杆菌抗体的含量(AU/mL);Y轴表示吸光度。

[0082] 取待测样本,同样按照上述步骤检测样本的吸光度差值,代入校准曲线,即可计算出待测样本中幽门螺杆菌抗体的含量。如果样本中幽门螺杆菌抗体浓度超出标准曲线的范围,为了保证检测的准确性,需要对样本进行适当稀释后在进行检测。

[0083] 三、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的特异性检测

[0084] 选取经内窥镜的胃黏膜萎缩及RUT判定为阳性或判定为阴性的500例人血清。用本发明试剂与已上市的试剂做比对。结果见表2,表3。

[0085] 表格2 新试剂和内窥镜检查的胃粘膜萎缩及RUT

[0086]

		内窥镜检查的胃粘膜萎缩及 RUT			
		阳性	阴性	总计	
本发明试剂	阳性	247	18	265	敏感度：95%
	阴性	13	222	235	特异性：92.5%
	总计	260	240	500	精确度：93.8%

[0087] 表格3 对比试剂和内窥镜检查的胃粘膜萎缩及RUT

[0088]

		内窥镜检查的胃粘膜萎缩及 RUT			
		阳性	阴性	总计	
对照试剂	阳性	195	114	309	敏感度：75%
	阴性	65	126	191	特异性：52.5%
	总计	260	240	500	精确度：64.2%

[0089] 将内窥镜发现胃黏膜萎缩且呈现RUT阳性的情况，视为幽门螺杆菌感染中(阳性)；而内窥镜未发现萎缩且呈现RUT阴性的情况，则视为幽门螺杆菌未感染(阴性)；对比试剂的评估成绩是，敏感度75%，特异性52.5%，精确度64.2%；相比之下本发明试剂的敏感度95%，特异性：92.5%，精确度：93.8%。

[0090] 本实施例显示了相比现有技术试剂，本发明所述的幽门螺杆菌检测试剂明显提高了致病菌的检测特异性，降低了检测中假阳及假阴性发生率，提高了检测的敏感度及精确性，对临床诊断更有指导意义。

[0091] 四、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的最低检测限检测

[0092] 按照如下的操作方法检测幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的最低检测限：

[0093] (1) 检测空白检出限 (LOB)：取含5%牛血清的生理盐水100mL，检测60次，并将数据从小到大排列，计算检测均值，SD。试验结果显示本发明试剂和对照试剂(国内已上市试剂)的空白检测限分别为0.4AU/mL，0.7AU/mL。

[0094] (2) 计算最低检测限：选择5例正常人血清样本，进行稀释后，每例样本检测12次，计算均值，SD。根据最低检测限代表能够区别于零的最低检测分析水平。它的计算值依赖于最低标准值的两倍标准差。将已经计算得到的空白检出限，代入下面公式 ($\{LOD=LOB+(2*SD)\}$) 即可求得最低检测限，本发明试剂和对照试剂(国内已上市试剂) 试验数据如表4,5所示。

[0095] 表格4发明试剂最低检测限试验结果

[0096]

重复次数	1号	2号	3号	4号	5号
1	0.7	0.6	0.3	0.8	0.4
2	0.6	0.9	0.1	0.3	0.1
3	0.5	0.3	0.5	0.5	0.2

[0097]

4	0.5	0.2	1.0	0.9	0.7
5	1.2	0.8	0.7	0.7	0.5
6	0.1	1.2	0.8	0.2	0.2
7	0.0	1.2	0.1	0.1	0.3
8	0.7	0.6	0.4	0.7	0.4
9	0.4	1.0	0.7	0.2	0.4
10	1.2	0.4	0.0	0.8	1.2
11	0.3	0.7	1.0	0.1	0.2
12	0.7	1.0	1.3	0.0	1.1
均值	0.58	0.75	0.58	0.42	0.47
SD	0.37	0.34	0.43	0.32	0.35
SD 均值	0.362				

[0098] 最低检出限 (LOD) = $0.4 + (2 * 0.362) = 1.124 \text{AU/mL}$;

[0099] 表格5对比试剂最低检测限试验结果

重复次数	1号	2号	3号	4号	5号
1	1.9	2.0	0.7	2.1	1.9
2	1.0	1.3	1.3	1.7	1.8
3	0.5	2.8	1.4	1.9	1.7
4	0.0	1.9	0.8	2.9	0.2
5	1.9	2.0	1.8	2.1	2.1
6	2.0	0.9	1.7	1.4	0.1
7	1.3	0.6	1.3	0.4	2.0
8	1.0	1.5	1.5	0.1	1.6
9	2.4	2.0	1.7	2.1	1.3
10	2.3	1.3	2.1	1.4	1.5
11	1.7	2.0	1.0	1.1	0.7
12	2.1	0.1	1.3	0.6	0.1
均值	1.51	1.54	1.38	1.49	1.24
SD	0.74	0.75	0.40	0.83	0.76
SD均值	0.697				

[0100] 最低检出限 (LOD) = 0.7 + (2 * 0.697) = 2.094 AU/mL;

[0101] 五、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的灵敏度检测

[0102] 用已知浓度的样本测试试剂,记录试剂在规定参数下产生的吸光度改变。换算为 5 AU/mL 幽门螺杆菌样本的吸光度差值,重复 2 次,吸光度差值应不小于 0.005;发明试剂及对比试剂结果均值见表 6

[0103] 表格 6 灵敏度的测定

[0104]

	本发明试剂		对比试剂	
	已知样本吸光度 (36 AU/mL)	0.1800	0.1807	0.1000
零点吸光度	0.0008	0.0010	0.0019	0.0016
5 AU/mL 样本吸光度	0.0249	0.0250	0.0136	0.0127
均值	0.02495		0.01316	

[0105] 本发明试剂把一定比例的东亚幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原经 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐 (DMTMM),通过化学交联法结合到超支化聚缩水甘油醚修饰的大小两种粒径的聚苯乙烯乳胶颗粒上,一方面经超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒亲水性增强,使得抗原抗体结合敏感度提高,抗原抗体结合反应更加迅速、牢固;另一方面通过大颗粒胶乳凝集作用放大了反应的检测级数,从而实现降低最低检测限,提高灵敏度的效果。发明试剂及对比试剂最低检测限及灵敏度试验结果证实本发明试剂实现了降低最低检测限,提高灵敏度的效果。

[0106] 六、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的线性研究

[0107] 用超出或等于线性范围上限浓度的样品和超出或等于线性范围下限浓度的样品,混合成至少 5 个浓度梯度。每个浓度测试 3 次,分别求出测定结果的均值 (y_i)。以稀释浓度 (x_i) 为自变量,以测定结果均值 (y_i) 为因变量求出线性回归方程。按公式 (1) 计算线性回归的相关系数 (r)。

[0108]

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \dots\dots\dots \text{公式 (1)}$$

[0109] 样本制备:

[0110] 对照试剂

稀释比例	2.5%	5%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
浓度 (AU/mL)	4.5	9.0	18.0	36.0	72.0	108.0	144.0	180.0

[0111] 本发明试剂

稀释比例	2%	4%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
浓度 (AU/mL)	4.0	10.0	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0

[0112] 回归分析结果如表 7 所示

[0113] 表格 7 线性回归分析

[0114]

对	理论值	4.5	9.0	18.0	36.0	72.0	108.0	144.0	180.0
照	预期值	4.83	9.18	17.88	35.28	70.08	104.88	139.68	174.48
试	实测值	4.3	7.9	16.0	40.8	61.8	93.5	158.5	171.0

[0115]

剂		4.9	9.0	18.5	39.4	71.7	105.1	153.3	160.2
		4.0	8.9	15.9	38.0	62.1	100.6	161.8	161.7
	均值	4.40	8.60	16.80	39.40	65.20	99.73	157.87	164.30
	绝对偏差	-0.4	-0.6	—	—	—	—	—	—
	相对偏差	—	—	-6.0%	11.7%	-7.0%	-4.9%	13.0%	-5.8%
	r 值	0.9914							
本 发 明 试 剂	理论值	4.0	10.0	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0
	预期值	4.08	10.12	25.24	50.42	100.80	151.17	201.55	251.92
	实测值	4.4	9.8	26.1	48.8	98.7	166.6	181.6	253.5
		3.7	9.7	24.9	47.7	104.0	167.6	180.0	248.3
		4.2	9.3	23.4	45.4	100.1	164.5	202.0	261.6
	均值	4.10	9.60	24.80	47.30	100.93	166.23	187.87	254.47
	绝对偏差	0.0	-0.5	—	—	—	—	—	—
	相对偏差	—	—	-1.7%	-6.2%	0.1%	10.0%	-6.8%	1.0%
	r 值	0.9965							

[0116] 本发明试剂通过选用大小两种粒径的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒,不仅有效扩展了检测试剂盒的线性范围;经超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒可确保抗原抗体的特异性有效结合,同时确保二者结合的稳定;本发明在扩展线性范围的同时,进一步优化了检测的准确性,提高了线性相关性。有测试结果可知本发明线性范围及拟合相关系数明显优于对照组。具体线性回归方程见图2,图3。

[0117] 七、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的稳定性研究

[0118] 使用本实施例所述试剂盒,对高、低两个水平的人血清样本[浓度在(10±2) AU/mL、(90±10) AU/mL]进行测定,每个水平样本重复测定10次,并分别与2℃~8℃放置20个月的试剂测定结果进行对比,验证测定结果的准确性,按正规统计学要求,计算每个水平样品测定结果的平均值和标准差,然后按公式:

$$[0119] \quad \text{标准差(SD)} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

[0120] 变异系数(CV) = 标准差/平均值 × 100%

[0121] 其中,X为测得的幽门螺杆菌抗体含量浓度值, \bar{X} 为测得的X值的平均数,n为重复测定次数;

[0122] 计算变异系数CV,结果列于下表8中。

[0123] 按公式 $B\% = (\bar{X} - T)/T \times 100\%$

[0124] 其中T为初始测定值均值, \bar{X} 为2℃~8℃放置20个月的测定值均值。计算2℃~8℃放置20个月测定值与初始测定值均值的相对偏差(B%),结果列于表8中。

[0125] 表格8 本发明试剂盒2℃~8℃长期放置20个月检测结果

[0126]

效期稳定性	样品	平均值 (AU/mL)	标准差	变异系数 (CV)	与初始值偏差 (B%)
0月	低值	9.98	0.25	2.5%	--
	高值	90.92	2.99	3.3%	--
放置3个月	低值	9.9	0.38	3.8%	-0.8%
	高值	91.77	2.81	3.1%	0.9%
放置6个月	低值	10.04	0.39	3.8%	0.6%
	高值	92.2	3.88	4.2%	1.4%
放置12个月	低值	10.08	0.38	3.8%	1.0%
	高值	92.65	4.07	4.4%	1.9%
放置18个月	低值	10.23	0.49	4.8%	2.5%
	高值	94.45	6.41	6.8%	3.9%
放置20个月	低值	10.29	0.61	5.9%	3.1%
	高值	96.95	8.44	8.7%	6.6%

[0127] 由表8可以看出本实施例所述试剂盒在2℃~8℃放置20个月,测定结果重复性CV均小于10%,且与初始测定值的偏差均小于10%,符合《体外诊断试剂通用要求》,表明本发明试剂盒重复性良好,具有较好的准确性和良好的稳定性。

[0128] 实施例2

[0129] 一、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的制备

[0130] 东亚幽门螺杆菌抗原的制备同实施例1中“东亚幽门螺杆菌抗原的制备”。

[0131] 试剂1的制备:50mmol/L的Tris-HCl缓冲液中,添加0.8%氯化钠,0.5%BSA,0.1%TRITON X-100,5%蔗糖,0.05%十二烷基葡萄糖苷,0.05%Proclin300,每种原料添加后均应搅拌均匀,直至原料添加结束后继续搅拌5min,静置2min,调pH至8.0,即得到试剂1。

[0132] 试剂2的制备:

[0133] 1) 胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于吡啶中,用丁二酸酐(Suc)进行修饰得到含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚。

[0134] 2) 胶乳颗粒标记:用含1%甘油,0.01%十二烷基葡萄糖苷的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液将胶乳颗粒稀释成5mg/mL,按与超支化聚缩水甘油醚微球所含羧基的摩尔比1:4的比例加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM),混匀活化10min;按与超支化聚缩水甘油醚羧基微球质量比:1:30加入待偶联抗原,37℃摇床孕育1h;加入含有

0.5%BSA, 0.01%十二烷基葡萄糖苷, 5%甘油及0.05%Proclin300的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液, 37℃摇床封闭1h; 0.22μm滤膜过滤; 将标记完成的乳胶颗粒分装成1mL/支, 4℃保存。

[0135] 3) 使用上述步骤分别对粒径为65nm和粒径为265nm的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶进行标记, 标记结束后, 将所述65nm胶乳和所述265nm胶乳, 按质量体积百分比计, 粒径为65nm的胶乳浓度为0.65%, 粒径为265nm的胶乳浓度为0.35%。

[0136] 4) 标记效率: 使用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测抗原标记剩余上清液中抗原浓度, 标记效率 = (标记总蛋白量 - 上清液中蛋白量) / 标记总蛋白量 * 100%。

[0137] 5) 抗原浓度的确定: 根据抗原过剩原则, 确定最适宜的抗原浓度, 选取线性最优; 用含有1%BSA, 3%甘油, 0.05%十二烷基葡萄糖苷及0.05%Proclin300的10mmol/L pH7.35±0.05 磷酸缓冲液, 稀释抗原浓度至4mg/mL, 即得到试剂2。

[0138] 校准品, 低值质控品和高值质控品的制备: 在10mmol/L, pH 7.3±0.05磷酸缓冲液中, 添加5%人血清、0.05%Proclin300、5%甘油、0.01%十二烷基葡萄糖苷及特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体, 其纯度≥95%, 使校准品的最终浓度分别为2.4mg/mL、1.2mg/mL、0.6mg/mL、0.2mg/mL、0.05mg/mL、0mg/mL (转化为活性单位分别为240AU/mL、120AU/mL、60AU/mL、20AU/mL、5AU/mL、0AU/mL), 高值质控品的最终浓度为0.9mg/mL (90AU/mL), 低值质控品的最终浓度为0.1mg/mL (10AU/mL)。

[0139] 本实施例中制备的幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒检测样本的方法, 同实施例1中“幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒检测样本的方法”; 依据检测步骤测得本发明校准品的标准曲线(如图4所示)。

[0140] 二、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的特异性检测

[0141] 选取经内窥镜的胃黏膜萎缩及RUT判定为阳性或判定为阴性的500例人血清。用本发明试剂与已上市的试剂做比对。结果见表9, 表10。

[0142] 表格9 本发明试剂和内窥镜检查的胃粘膜萎缩及RUT

[0143]

		内窥镜检查的胃粘膜萎缩及 RUT				
		阳性	阴性	总计		
本发明试剂	阳性	255	10	265	敏感度	98.1%
	阴性	5	230	235	特异性	95.8%
	总计	260	240	500	精确度	97.0%

[0144] 表格10 对照试剂和内窥镜检查的胃粘膜萎缩及RUT

[0145]

		内窥镜检查的胃粘膜萎缩及 RUT				
		阳性	阴性	总计		
对照试剂	阳性	195	114	309	敏感度	75.0%
	阴性	65	126	191	特异性	52.5%
	总计	260	240	500	精确度	64.2%

[0146] 将内窥镜发现胃黏膜萎缩且呈现RUT阳性的情况,视为幽门螺杆菌感染中(阳性);而内窥镜未发现萎缩且呈现RUT阴性的情况,则视为幽门螺杆菌未感染(阴性);对比试剂的评估成绩是,敏感度75%,特异性52.5%,精确度64.2%;相比之下本发明试剂的敏感度98.1%,特异性:95.8%,精确度:97%。

[0147] 本实施例显示了相比现有技术试剂,本发明所述的幽门螺杆菌检测试剂明显提高了致病菌的检测特异性,降低了检测中假阳及假阴性发生率,提高了检测的敏感度及精确性,对临床诊断更有指导意义。

[0148] 三、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的最低检测限检测

[0149] 按照如下的操作方法检测幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的最低检测限:

[0150] (1) 检测空白检出限 (LOB):取含5%牛血清的生理盐水100mL,检测60次,并将数据从小到大排列,计算检测均值,SD。试验结果显示本发明试剂和对照试剂(国内已上市试剂)的空白检测限分别为0.30AU/mL,0.7AU/mL。

[0151] (2) 计算最低检测限:选择5例正常人血清样本,进行稀释后,每例样本检测12次,计算均值,SD。根据最低检测限代表能够区别于零的最低检测分析水平。它的计算值依赖于最低标准值的两倍标准差。将已经计算得到的空白检出限,代入下面公式 ($\{LOD=LOB+(2*SD)\}$) 即可求得最低检测限,本发明试剂和对照试剂(国内已上市试剂) 试验数据如表11, 12所示。

[0152] 表格11发明试剂最低检测限试验结果

重复次数	1号	2号	3号	4号	5号
1	0.4	0.7	0.5	0.2	0.8
2	0.0	0.0	0.1	0.2	0.8
3	0.3	0.4	0.5	0.8	0.2
4	0.3	0.1	0.0	0.2	0.6
5	0.4	0.0	0.3	0.4	0.1
6	0.5	0.4	0.7	0.8	0.3
7	0.4	0.6	0.2	0.4	0.8
8	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4
9	0.3	0.1	0.0	0.3	0.3
10	0.3	1.1	0.0	0.2	0.7
11	0.2	0.7	0.0	0.1	0.2
12	0.1	0.0	0.1	0.1	0.5
均值	0.28	0.39	0.23	0.32	0.47
SD	0.15	0.34	0.25	0.24	0.27
SD均值	0.249				

[0153] 最低检出限 (LOD) = $0.3+(2*0.249) = 0.798AU/mL$;

[0154] 表格12 对比试剂最低检测限试验结果

[0155]

重复次数	1号	2号	3号	4号	5号
1	1.0	2.0	0.5	0.5	2.4
2	0.1	0.8	1.5	0.1	0.7
3	0.5	0.6	0.8	1.0	0.5
4	0.2	0.2	2.8	0.3	0.3

[0156]

5	0.6	0.2	2.7	0.0	0.8
6	1.6	2.0	1.2	0.6	1.1
7	0.2	0.1	0.9	2.3	1.0
8	1.5	1.3	2.1	2.4	1.4
9	2.1	0.2	1.6	1.3	0.0
10	0.4	0.4	0.5	1.1	0.4
11	0.4	0.5	1.9	1.2	0.5
12	0.5	1.9	1.4	0.2	0.7
均值	0.76	0.84	1.51	0.92	0.83
SD	0.64	0.76	0.77	0.80	0.63
SD 均值	0.721				

[0157] 最低检出限 (LOD) = $0.7 + (2 * 0.721) = 2.142 \text{ AU/mL}$;

[0158] 四、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的灵敏度检测

[0159] 用已知浓度的样本测试试剂,记录试剂在规定参数下产生的吸光度改变。换算为 5AU/mL 幽门螺杆菌样本的吸光度差值,重复2次,吸光度差值应不小于0.005;发明试剂及对比试剂结果均值见表13

[0160] 表格13灵敏度的测定

[0161]

	本发明试剂		对比试剂	
	已知样本吸光度 (36AU/mL)	0.1900	0.1907	0.0902
零点吸光度	0.0017	0.0018	0.0012	0.0014
5AU/mL 样本吸光度	0.0262	0.0262	0.0124	0.0136
均值	0.02619		0.01296	

[0162] 结果显示本发明试剂的灵敏度优于对照试剂。

[0163] 本发明试剂通过把一定比例的东亚幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原经4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐 (DMTMM),通过化学交联法结合到超支化聚缩水甘油醚

修饰的大小两种粒径的聚苯乙烯乳胶颗粒上,一方面经超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒亲水性增强,使得抗原抗体结合敏感度提高,抗原抗体结合反应更加迅速、牢固;另一方面通过大颗粒胶乳凝集作用放大了反应的检测级数,从而实现降低最低检测限,提高灵敏度的效果。发明试剂及对比试剂最低检测限及灵敏度试验结果证实本发明试剂实现了降低最低检测限,提高灵敏度的效果。

[0164] 五、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的线性研究

[0165] 用超出或等于线性范围上限浓度的样品和超出或等于线性范围下限浓度的样品,混合成至少5个浓度梯度。每个浓度测试3次,分别求出测定结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(1)计算线性回归相关系数(r)。

[0166] 样本制备:

[0167] 对照试剂

稀释比例	2.5%	5%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
浓度(AU/mL)	4.5	9.0	18.0	36.0	72.0	108.0	144.0	180.0

[0168] 本发明试剂

稀释比例	2%	4%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
浓度(AU/mL)	4.0	10.0	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0

[0169] 回归分析结果如表14所示

[0170] 表格14 线性回归分析

[0171]

对照试剂	理论值	4.5	9.0	18.0	36.0	72.0	108.0	144.0	180.0
	预期值	8.49	12.57	20.72	37.03	69.64	102.26	134.87	167.49
	实测值	5.1	9.3	18.3	33.8	79.1	113.2	139.2	153.1
		4.6	10.2	18.8	33.2	78.2	112.4	142.5	155.2
		5.2	10.5	19.0	34.4	77.5	110.0	141.8	154.6
	均值	4.97	10.00	18.70	33.80	78.27	111.87	141.17	154.30
	绝对偏差	-3.5	-2.6	—	—	—	—	—	—
	相对偏差	—	—	-9.8%	-8.7%	12.4%	9.4%	4.7%	-7.9%
	r 值	0.9919							
本发明试剂	理论值	4.0	10.0	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0
	预期值	6.49	12.33	26.92	51.24	99.88	148.51	197.15	245.79
	实测值	4.2	9.8	25.8	52.8	99.6	151.2	198.2	230.5
		3.8	10.9	24.7	54.0	103.0	155.4	201.0	242.8
		4.0	11.0	26.1	50.3	104.8	153.0	208.0	240.0
	均值	4.00	10.57	25.53	52.37	102.47	153.20	202.40	237.77
	绝对偏差	-2.5	-1.8	—	—	—	—	—	—
	相对偏差	—	—	-5.1%	2.2%	2.6%	3.2%	2.7%	-3.3%
	r 值	0.9988							

[0172] 本发明试剂通过选用大小两种粒径的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒,不仅有效扩展了检测试剂盒的线性范围;经超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒可确保抗原抗体的特异性有效结合,同时确保二者结合的稳定性;本发明在扩展线性范围的同时,进一步优化了检测的准确性,提高了线性相关性。有测试结果可知本发明线性范围及拟合相关系数明显优于对照组。具体线性回归方程见图5,图6。

[0173] 六、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的稳定性研究

[0174] 使用本实施例所述试剂盒,对高、低两个水平的人血清样本浓度在 (10 ± 2) AU/mL、 (90 ± 10) AU/mL]进行测定,每个水平样本重复测定10次,并分别与 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 放置20个月的试剂测定结果进行对比,验证测定结果的准确性,按正规统计学要求,计算每个水平样品测定结果的平均值和标准差,然后按公式:

$$[0175] \quad \text{标准差(SD)} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

[0176] 变异系数(CV) = 标准差/平均值 $\times 100\%$

[0177] 其中,X为测得的幽门螺杆菌抗体含量浓度值, \bar{X} 为测得的X值的平均数,n为重复测定次数;

[0178] 计算变异系数CV,结果列于下表15中。

[0179] 按公式 $B\% = (\bar{X} - T)/T \times 100\%$

[0180] 其中T为初始测定值均值, \bar{X} 为2℃~8℃放置20个月的测定值均值。

[0181] 计算2℃~8℃放置20个月测定值与初始测定值均值的相对偏差(B%),结果列于表15中。

[0182] 表格15 本发明试剂盒2℃~8℃长期放置20个月检测结果

[0183]

效期稳定性	样品	平均值 (AU/mL)	标准差	变异系数 (CV)	与初始值偏差 (B%)
0月	低值	10.27	0.25	2.4%	--
	高值	91.52	3.14	3.4%	--
放置3个月	低值	10.5	0.35	3.3%	2.2%
	高值	91.29	3.45	3.8%	-0.3%
放置6个月	低值	10.23	0.35	3.4%	-0.4%
	高值	92.5	3.32	3.6%	1.1%
放置12个月	低值	10.22	0.37	3.6%	-0.5%
	高值	91.44	4.17	4.6%	-0.1%
放置18个月	低值	10.08	0.46	4.6%	-1.9%
	高值	93.2	4.55	4.9%	1.8%
放置20个月	低值	10.5	0.63	6.0%	2.2%
	高值	96.3	5.57	5.8%	5.2%

[0184] 由表15可以看出本实施例所述试剂盒在2℃~8℃放置20个月,测定结果重复性CV均小于10%,且与初始测定值的偏差均小于10%,符合《体外诊断试剂通用要求》,表明本发明试剂盒重复性良好,具有较好的准确性和良好的稳定性。

[0185] 实施例3

[0186] 一、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的制备

[0187] 东亚幽门螺杆菌抗原的制备同实施例1中“东亚幽门螺杆菌抗原的制备”。

[0188] 试剂1的制备:50mmol/L的Tris-HCl缓冲液中,添加0.8%氯化钠,0.8%BSA,0.5%TRITON X-100,2%蔗糖,0.01%十二烷基葡萄糖苷,0.05%Proclin300,每种原料添加后均应搅拌均匀,直至原料添加结束后继续搅拌5min,静止2min,调pH至8.4,即得到试剂1。

[0189] 试剂2的制备:

[0190] 1) 胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于吡啶中,用丁二酸酐(Suc)进行修饰得到含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚。

[0191] 2) 胶乳颗粒标记:用含1%甘油,0.01%十二烷基葡萄糖苷的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液将胶乳颗粒稀释成5mg/mL,按与超支化聚缩水甘油醚微球所含羧基的摩尔比1:5的比例加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM),混匀活化10min;按与

超支化聚缩水甘油醚羧基微球质量比:1:50加入待偶联抗原,37℃摇床孕育2h;加入含有0.5%BSA,0.01%十二烷基葡萄糖苷,5%甘油及0.05%Proclin300的10mmol/LpH7.4磷酸缓冲液,37℃摇床封闭2h;0.22μm滤膜过滤;将标记完成的乳胶颗粒分装成1mL/支,4℃保存。

[0192] 3) 使用上述步骤分别对粒径为80nm和粒径为250nm的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶进行标记,标记结束后,将所述80nm胶乳和所述250nm胶乳,按质量体积百分比计,粒径为80nm的胶乳浓度为0.85%,粒径为250nm的胶乳浓度为0.25%。

[0193] 4) 标记效率:使用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测抗原标记剩余上清液中抗原浓度,标记效率=(标记总蛋白量-上清液中蛋白量)/标记总蛋白量*100%。

[0194] 5) 抗原浓度的确定:根据抗原过剩原则,确定最适宜的抗原浓度,选取线性最优;用含有0.8%BSA,2.5%甘油,0.01%十二烷基葡萄糖苷及0.05%Proclin300的10mmol/L pH7.35±0.05磷酸缓冲液,稀释抗原浓度至5mg/mL,即得到试剂2。

[0195] 校准品,低值质控品和高值质控品的制备:在10mmol/L,pH 7.3±0.05磷酸缓冲液中,添加5%人血清、0.05%Proclin300、5%甘油、0.01%十二烷基葡萄糖苷及特异性东亚幽门螺杆菌兔抗人抗体,其纯度≥95%,使校准品的最终浓度分别为2.88mg/mL、1.44mg/mL、0.72mg/mL、0.24mg/mL、0.06mg/mL、0mg/mL(转化为活性单位分别为288AU/mL、144AU/mL、72AU/mL、24AU/mL、6AU/mL、0AU/mL),高值质控品的最终浓度为1.08mg/mL(108AU/mL),低值质控品的最终浓度为0.12mg/mL(12AU/mL)。

[0196] 本实施例中制备的幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒检测样本的方法,同实施例1中“幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒检测样本的方法”;依据检测步骤测得本发明校准品的标准曲线(如图7所示)。

[0197] 二、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的特异性检测

[0198] 选取经内窥镜的胃黏膜萎缩及RUT判定为阳性或判定为阴性的500例人血清。用本发明试剂与已上市的试剂做比对。结果见表16,表17。

[0199] 表格16本发明试剂和内窥镜检查的胃粘膜萎缩及RUT

[0200]

		内窥镜检查的胃粘膜萎缩及 RUT			敏感度: 87.3%
		阳性	阴性	总计	
本发明试剂	阳性	227	28	255	

[0201]

	阴性	33	212	245	特异性: 88.3%
	总计	260	240	500	精确度: 87.8%

[0202] 表格17对照试剂和内窥镜检查的胃粘膜萎缩及RUT

[0203]

		内窥镜检查的胃粘膜萎缩及 RUT			
		阳性	阴性	总计	
对照试剂	阳性	195	114	309	敏感度：75%
	阴性	65	126	191	特异性：52.5%
	总计	260	240	500	精确度：64.2%

[0204] 将内窥镜发现胃黏膜萎缩且呈现RUT阳性的情况,视为幽门螺杆菌感染中(阳性);而内窥镜未发现萎缩且呈现RUT阴性的情况,则视为幽门螺杆菌未感染(阴性);对比试剂的评估成绩是,敏感度75%,特异性52.5%,精确度64.2%;相比之下本发明试剂的敏感度87.3%,特异性:88.3%,精确度:87.8%。

[0205] 本实施例显示了相比现有技术试剂,本发明所述的幽门螺杆菌检测试剂明显提高了致病菌的检测特异性,降低了检测中假阳及假阴性发生率,提高了检测的敏感度及精确性,对临床诊断更有指导意义。

[0206] 三、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的最低检测限检测

[0207] 按照如下的操作方法检测幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的最低检测限:

[0208] (1) 检测空白检出限 (LOB):取含5%牛血清的生理盐水100mL,检测60次,并将数据从小到大排列,计算检测均值,SD。实验结果显示本发明试剂和对照试剂(国内已上市试剂)的空白检出限分别为0.6AU/mL,0.7AU/mL。

[0209] (2) 计算最低检测限:选择5例正常人血清样本,进行10稀释后,每例样本检测12次,计算均值,SD。根据最低检测限代表能够区别于零的最低检测分析水平。它的计算值依赖于最低标准值的两倍标准差。将已经计算得到的空白检出限,代入下面公式 ($\{LOD=LOB+(2*SD)\}$) 即可求得最低检测限,本发明试剂和对照试剂(国内已上市试剂) 试验数据如表18,19所示。

[0210] 表格18发明试剂最低检测限试验结果

[0211]

重复次数	1号	2号	3号	4号	5号
1	0.6	0.6	1.0	0.2	0.8
2	0.4	0.1	0.4	1.2	0.4
3	0.9	0.4	0.5	0.5	1.6
4	1.1	1.9	0.2	0.5	0.4
5	2.3	0.7	0.4	1.0	2.1
6	0.6	0.6	1.2	0.2	0.7
7	1.1	1.1	0.1	0.2	1.1
8	0.6	1.1	0.2	0.6	1.8

[0212]

9	0.8	0.2	0.8	2.3	0.7
10	0.3	0.3	0.0	0.8	1.2
11	1.4	0.6	0.2	1.3	0.2
12	1.2	0.8	0.3	0.4	0.0
均值	0.95	0.73	0.44	0.76	0.92
SD	0.54	0.49	0.38	0.62	0.67
SD 均值	0.537				

[0213] 最低检出限 (LOD) = 0.6 + (2 * 0.537) = 1.674 AU/mL;

[0214] 表格19 对比试剂最低检测限试验结果

重复次数	1号	2号	3号	4号	5号
1	0.2	1.8	0.7	0.8	1.2
2	2.3	0.5	1.6	0.9	0.5
3	1.2	0.6	1.4	0.2	0.2
4	0.3	1.0	2.0	0.8	0.3
5	2.8	0.6	0.3	1.6	1.7
6	1.7	0.8	0.0	1.1	1.1
7	0.3	0.3	3.1	2.2	1.0
8	1.3	1.3	1.6	0.7	1.1
9	0.3	2.1	0.1	2.2	1.2
10	0.6	0.9	1.5	0.0	1.6
11	1.2	1.4	0.1	1.5	1.7
12	0.1	0.5	0.4	1.4	0.8
均值	0.49	0.50	2.61	1.26	1.06
SD	0.89	0.57	0.96	0.71	0.50
SD均值	0.726				

[0215] 最低检出限 (LOD) = 0.7 + (2 * 0.726) = 2.152 AU/mL;

[0216] 四、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的灵敏度检测

[0217] 用已知浓度的样本测试试剂,记录试剂在规定参数下产生的吸光度改变。换算为5AU/mL幽门螺杆菌样本的吸光度差值,重复2次,吸光度差值应不小于0.005;发明试剂及对比试剂结果均值见表20

[0218] 表格20灵敏度的测定

[0219]

	本发明试剂		对比试剂	
已知样本吸光度(36AU/mL)	0.1556	0.1589	0.0969	0.0934
零点吸光度	0.0014	0.0019	0.0017	0.0018

[0220]

5AU/mL 样本吸光度	0.0214	0.0218	0.0132	0.0127
均值	0.02161		0.01297	

[0221] 结果显示本发明试剂的灵敏度优于对照试剂。

[0222] 本发明试剂通过把一定比例的东亚幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原经4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM),通过化学交联法结合到超支化聚缩水甘油醚修饰的大小两种粒径的聚苯乙烯乳胶颗粒上,一方面经超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒亲水性增强,使得抗原抗体结合敏感度提高,抗原抗体结合反应更加迅速、牢固;另一方面通过大颗粒胶乳凝集作用放大了反应的检测级数,从而实现降低最低检测限,提高灵敏度的效果。发明试剂及对比试剂最低检测限及灵敏度试验结果证实本发明试剂实现了降低最低检测限,提高灵敏度的效果。

[0223] 五、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的线性研究

[0224] 用超出或等于线性范围上限浓度的样品和超出或等于线性范围下限浓度的样品,混合成至少5个浓度梯度。每个浓度测试3次,分别求出测定结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(1)计算线性回归相关系数(r)。

[0225] 样本制备:

[0226] 对照试剂

稀释比例	2.5%	5%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
浓度(AU/mL)	4.5	9.0	18.0	36.0	72.0	108.0	144.0	180.0

[0227] 本发明试剂

稀释比例	2%	4%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
浓度(AU/mL)	4.0	10.0	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0

[0228] 回归分析结果如表21所示

[0229] 表格21 线性回归分析

[0230]

对照试剂	理论值	4.5	9.0	18.0	36.0	72.0	108.0	144.0	180.0
	预期值	8.26	12.36	20.55	36.95	69.74	102.53	135.33	168.12
	实测值	4.8	9.2	17.9	35.8	72.9	113.2	139.2	153.2
		4.3	10.0	18.5	35.0	75.7	112.5	144.8	154.8
		4.2	9.8	18.9	36.3	79.0	110.9	146.7	153.9
	均值	4.43	9.67	18.43	35.70	75.87	112.20	143.57	153.97
	绝对偏差	-3.8	-2.7	—	—	—	—	—	—
	相对偏差	—	—	-10.3%	-3.4%	8.8%	9.4%	6.1%	-8.4%
	r 值	0.9918							
本发	理论值	4.0	10.0	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0
	预期值	6.69	12.33	26.42	49.90	96.87	143.83	190.80	237.76

[0231]

明试剂	实测值	3.9	10.5	25.3	46.8	101.6	159.0	183.8	227.0
		4.2	10.0	25.0	47.9	106.0	161.8	181.0	228.6
		3.7	9.8	24.6	46.4	102.8	152.9	190.7	240.5
	均值	3.93	10.10	24.97	47.03	103.47	157.90	185.17	232.03
	绝对偏差	-2.8	-2.2	—	—	—	—	—	—
	相对偏差	—	—	-5.5%	-5.7%	6.8%	9.8%	-3.0%	-2.4%
	r 值	0.9969							

[0232] 本发明试剂通过选用大小两种粒径的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒,不仅有效扩展了检测试剂盒的线性范围;经超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯乳胶颗粒可确保抗原抗体的特异性有效结合,同时确保了二者结合的稳定性;本发明在扩展线性范围的同时,进一步优化了检测的准确性,提高了线性相关性。有测试结果可知本发明线性范围及拟合相关系数明显优于对照组。具体线性回归方程见图8,图9。

[0233] 六、幽门螺杆菌致病菌株抗体测定试剂盒的稳定性研究

[0234] 使用本实施例所述试剂盒,对高、低两个水平的人血清样本浓度在 (10 ± 2) AU/mL、 (90 ± 10) AU/mL]进行测定,每个水平样本重复测定10次,并分别与 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 放置20个月的试剂测定结果进行对比,验证测定结果的准确性,按正规统计学要求,计算每个水平样品测定结果的平均值和标准差,然后按公式:

$$[0235] \quad \text{标准差(SD)} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

[0236] 变异系数(CV) = 标准差/平均值 $\times 100\%$

[0237] 其中,X为测得的幽门螺杆菌抗体含量浓度值, \bar{X} 为测得的X值的平均数,n为重复测定次数;

[0238] 计算变异系数CV,结果列于下表22中。

[0239] 按公式 $B\% = (\bar{X} - T)/T \times 100\%$

[0240] 其中T为初始测定值均值, \bar{X} 为2℃~8℃放置20个月的测定值均值。

[0241] 计算2℃~8℃放置20个月测定值与初始测定值均值的相对偏差(B%),结果列于表22中。

[0242] 表格22 本发明试剂盒2℃~8℃长期放置20个月检测结果

[0243]

效期稳定性	样品	平均值 (AU/mL)	标准差	变异系数 (CV)	与初始值偏差 (B%)
0月	低值	9.95	0.46	4.6%	--
	高值	89.98	4.37	4.9%	--
放置3个月	低值	10.05	0.46	4.6%	1.0%
	高值	90.71	3.87	4.3%	0.8%
放置6个月	低值	10.17	0.43	4.2%	2.2%
	高值	90.34	4.22	4.7%	0.4%

[0244]

放置12个月	低值	10.31	0.54	5.2%	3.6%
	高值	91.51	4.61	5.0%	1.7%
放置18个月	低值	10.41	0.80	7.7%	4.6%
	高值	94.59	5.84	6.2%	5.1%
放置20个月	低值	10.84	0.92	8.5%	8.9%
	高值	98.48	7.84	8.0%	9.4%

[0245] 由表22可以看出本实施例所述试剂盒在2℃~8℃放置20个月,测定结果重复性CV均小于10%,且与初始测定值的偏差均小于10%,符合《体外诊断试剂通用要求》,表明本发明试剂盒重复性良好,具有较好的准确性和良好的稳定性。

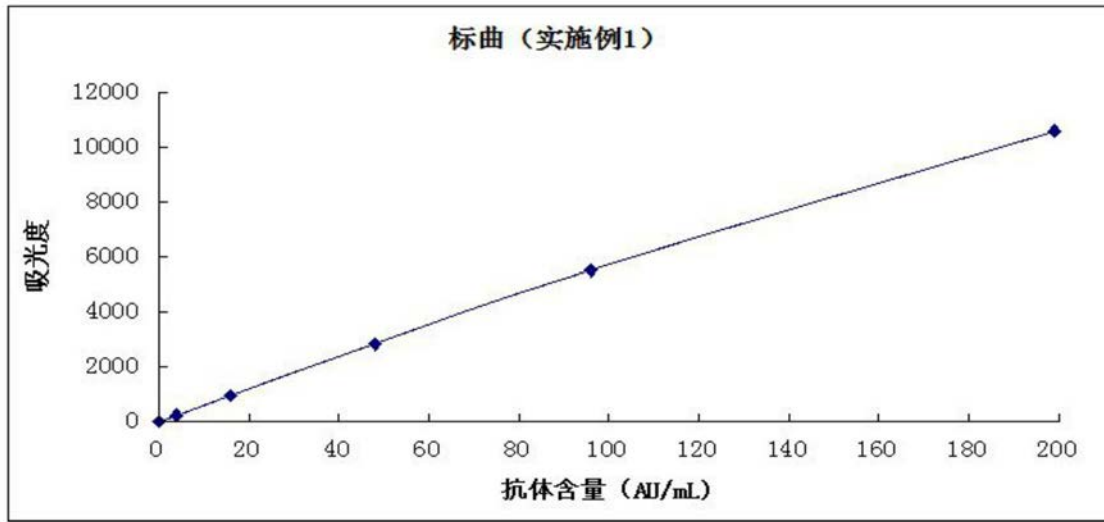


图1

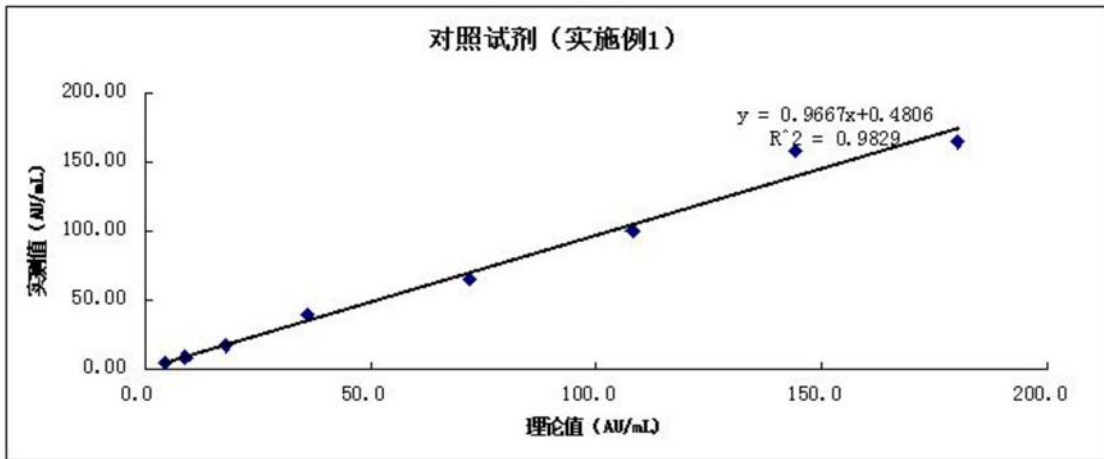


图2

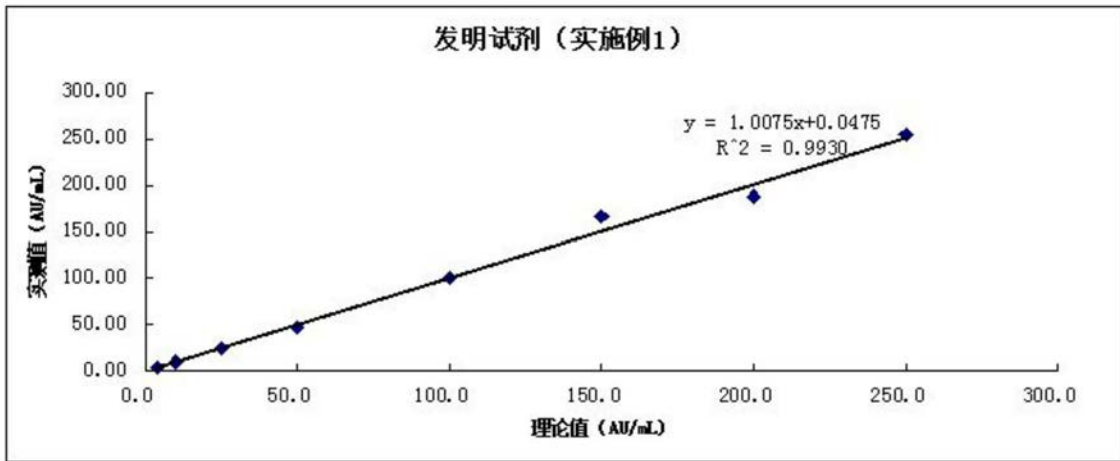


图3

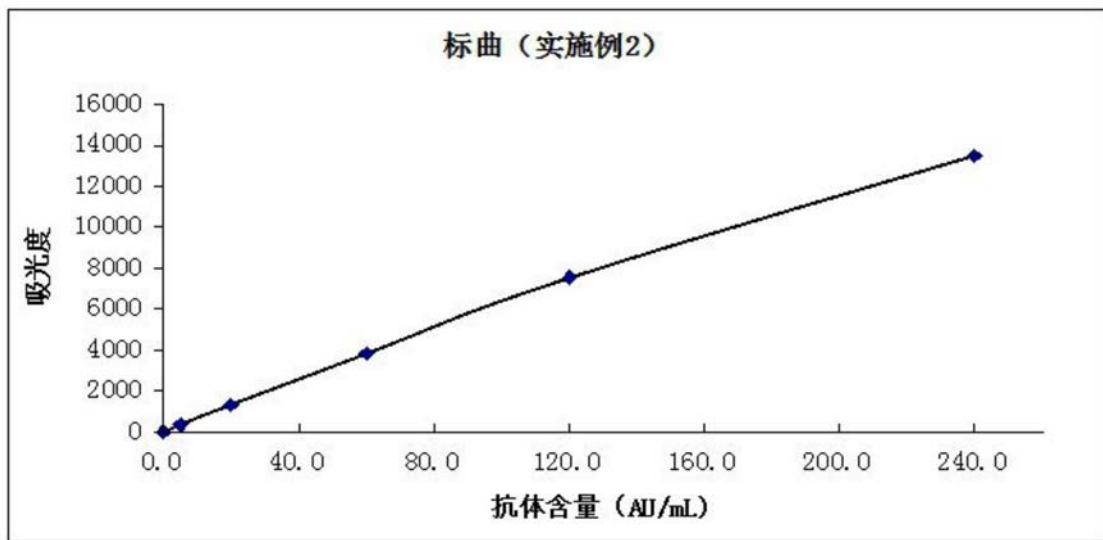


图4

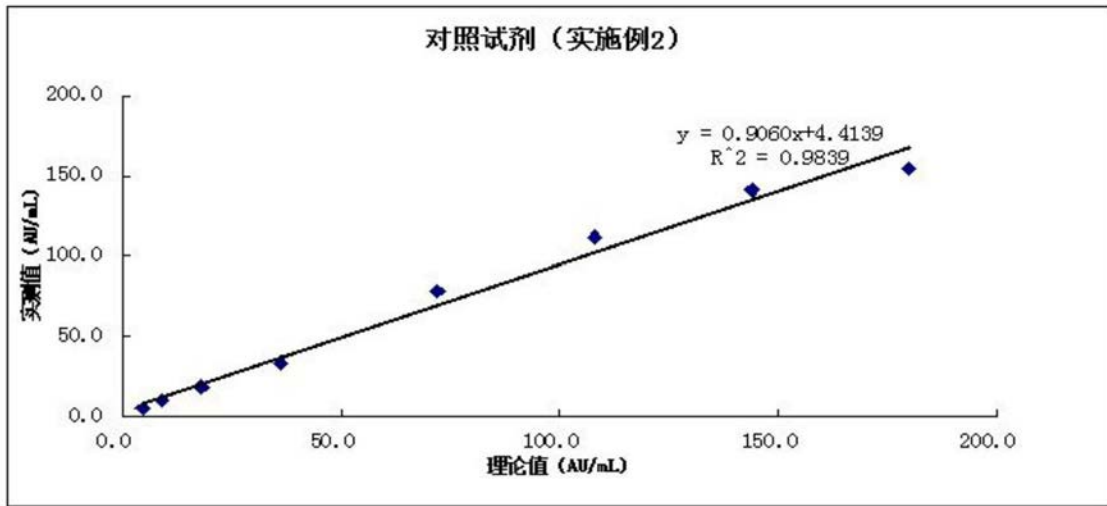


图5

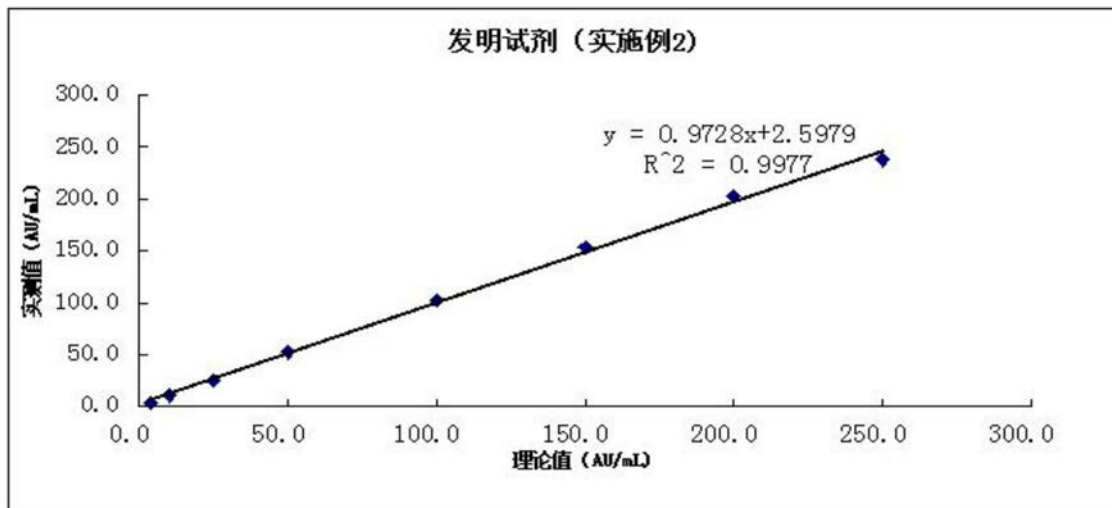


图6

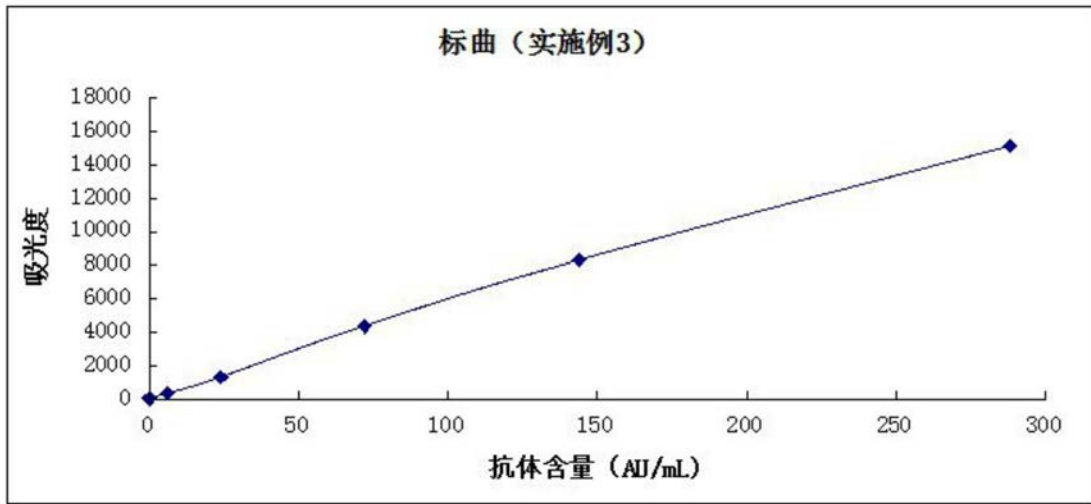


图7

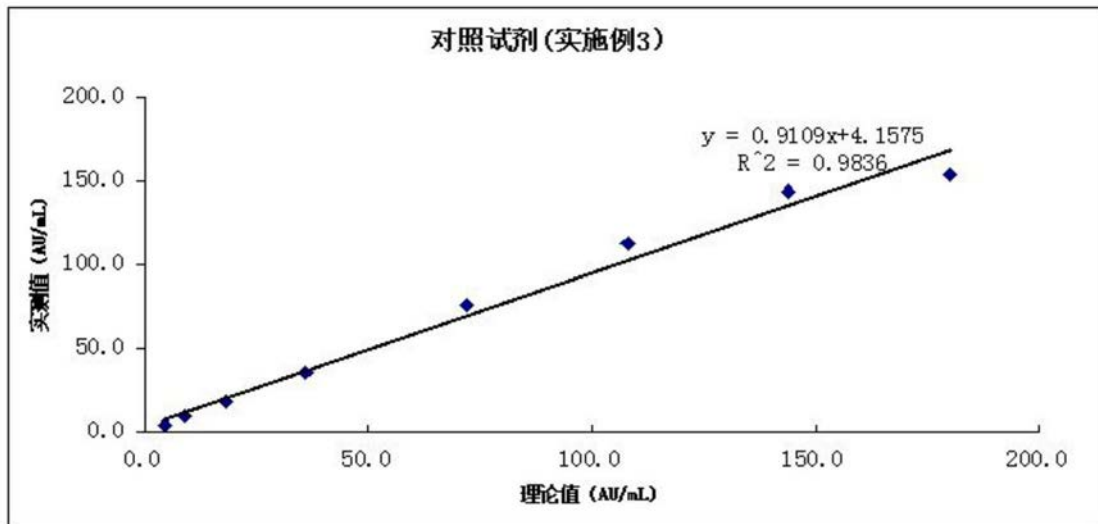


图8

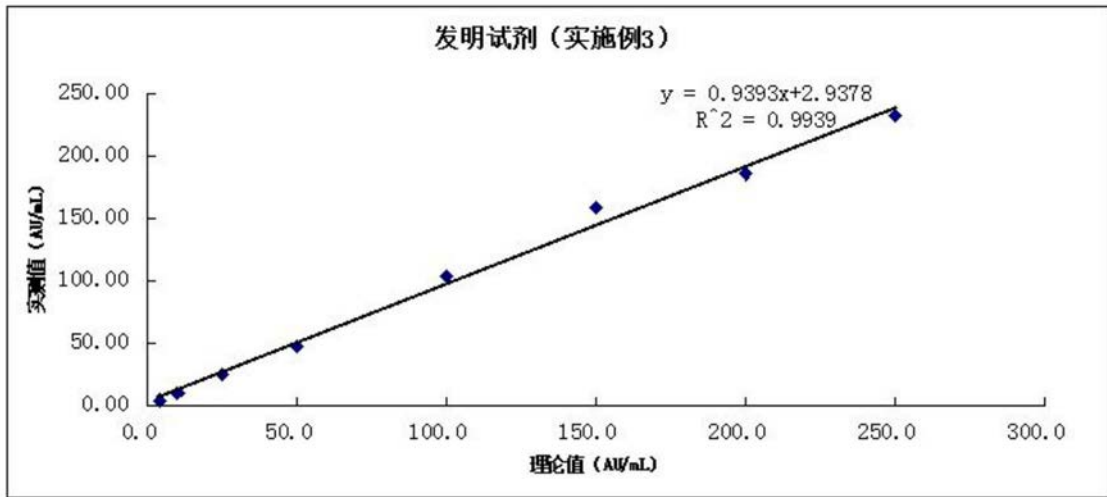


图9

专利名称(译)	一种提高幽门螺杆菌致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊测定试剂盒		
公开(公告)号	CN107192821B	公开(公告)日	2019-08-09
申请号	CN201710325483.6	申请日	2017-05-10
[标]发明人	李雪 潘玥 许泼实		
发明人	李雪 潘玥 许泼实		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/82 C12Q1/689 C12Q1/04 C12N1/20 C12R1/01		
CPC分类号	C12N1/20 C12Q1/689 G01N21/82 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/544 G01N33/56922 G01N2021/825		
其他公开文献	CN107192821A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种提高幽门致病菌株抗体检出率的改性胶乳免疫比浊试剂盒，该试剂盒由分别放置的试剂1，试剂2、校准品、低值质控品和高值质控品组成。通过前期对幽门螺杆菌菌株进行分型鉴定，提高了致病性菌株的检出率；抗原包被过程中选用4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)作为超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球与抗原结合的交联剂，在增加偶联效率的同时利用超支化聚缩水甘油醚的亲水特性保护偶联抗原构象，提高抗原抗体特异性结合；试剂配制过程中选择了一种新型的表面活性剂十二烷基葡萄糖苷，在与其他活性剂、稳定剂、保护剂及防腐剂的共同作用下，有效提高了试剂脂类杂质及杂质蛋白清除能力。

申请人	专利名称	技术平台	发明点	技术特点	专利号
深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司	一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其检测方法	胶乳免疫比浊法	1)幽门螺杆菌特异性抗原包括：幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原，幽门螺杆菌尿素酶抗原，幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A或幽门螺杆菌细胞空泡毒素A抗原；2)选用的胶乳粒径为	1) 定量检测，灵敏度高，可达到2.0AU/mL,线性范围可达到(5~180) AU/mL; 2)稳定性2-8度贮存12个月	201110219 417.3