



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103185777 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201110453951. 0

(22) 申请日 2011. 12. 30

(71) 申请人 深圳市亚辉龙生物科技有限公司

地址 518054 广东省深圳市南山区兴海路荔
山工业区 5 栋 1-4 层

(72) 发明人 胡德明 刘清波 何林 阳辉

(74) 专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公
司 44218

代理人 胡坚

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

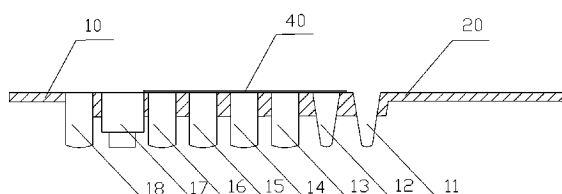
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置及其方法

(57) 摘要

本发明申请公开一种检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置及其方法,所述的试剂装置为长条状,包括具有八个孔位的基体和位于基体一端的手柄,八个孔位的排列顺序从近手柄端开始依次为样本孔、辅剂孔、酶结合物孔、底物孔、终止液孔、稀释液孔、反应孔和稀释孔。本发明申请基于酶联免疫检测的原理,利用上述的试剂装置对抗 Jo-1 抗体进行检测,是一种独立的、单人份的分析检测方法,并且可以与相应的特定分析仪器配合使用,在检测过程中,用全自动的精密加液器来加注检测试剂或样本,具有操作自动化,加量精确,检测结果的准确度和精密度高的优点,具有广阔的应用前景。



1. 一种检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置,其特征在于:所述的试剂装置为长条状,包括具有八个孔位的基体和位于基体一端的手柄,八个孔位的排列顺序从近手柄端开始依次为样本孔、辅剂孔、酶结合物孔、底物孔、终止液孔、稀释液孔、反应孔和稀释孔,样本孔内盛有待测样本,辅剂孔供检测有需要时加入辅助试剂使用,酶结合物孔内盛有酶结合物溶液,底物孔内盛有底物溶液,终止液孔内盛有终止液,稀释液孔内盛有稀释液,反应孔为平底且具有较高的光通透性,孔内包被有 Jo-1 抗原,并作为反应容器加注待测的液体样本和检测试剂及洗涤液,反应终止后进行吸光度测定,稀释孔作为样本稀释容器,供稀释样本时用。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂装置,其特征在于:所述的试剂装置中,辅剂孔、酶结合物孔、底物孔、终止液孔和稀释液孔上覆盖有密封薄膜。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂装置,其特征在于:所述的手柄上粘贴有条形码,该条形码标识有抗 Jo-1 抗体检测试剂及分析装置的相关信息。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂装置,其特征在于:所述的信息包括检测项目代码、检测试剂生产批号、试剂有效期、定量检测标准曲线参数、酶联免疫反应类型、试剂及分析装置的序列号。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂装置,其特征在于:所述试剂装置还包括若干个支撑柱,所述的支撑柱位于所述试剂装置中基体的下面,相邻支撑柱之间间隔有一个以上的孔位。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂装置,其特征在于:所述试剂装置中反应孔由外孔和内孔构成,外孔的底部开有底孔,内孔穿过底孔且与底孔紧配合,外孔和内孔之间留有防溢腔。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂装置,其特征在于:所述试剂装置中反应孔的内孔包被的 Jo-1 抗原包括牛胸腺 Jo-1、小鼠 Jo-1、兔 Jo-1 或重组人 Jo-1。

8. 一种利用权利要求 1-7 所述的试剂装置进行抗 Jo-1 抗体检测的方法,其特征在于,所述的方法包括如下的步骤:

- 1) 在所述的样本孔中加入未稀释的样本;
- 2) 从稀释液孔中吸取稀释液加入稀释孔中;
- 3) 移除稀释液孔中的剩余液体,从稀释孔中吸取部分液体回稀释液孔;
- 4) 从样本孔中吸取样本加入稀释液孔中,将样本进行稀释;
- 5) 从稀释液孔中吸取液体加入稀释孔中,将样本进行进一步的稀释;
- 6) 从稀释孔中吸取液体加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,孵育 30 ~ 60min;
- 7) 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体;
- 8) 从酶结合物孔中吸取酶结合物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 30 ~ 60min 后移除液体;
- 9) 重复步骤 7);
- 10) 从底物孔中吸取底物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 10 ~ 20min;
- 11) 从终止液孔中吸取终止液加入反应孔中,1 ~ 10min 内于 450nm 读取 OD 值,或选择双波长法测定,波长范围在 620nm ~ 690nm。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述的方法包括如下的步骤:

- 1) 在所述的样本孔中加入未稀释的样本,体积至少为样本孔容量的 1/4;

- 2) 从稀释液孔中吸取稀释液加入稀释孔中,吸取的量为孔内液体总量的 7/10 以上;
- 3) 移除稀释液孔中的剩余液体,根据预期稀释倍数从稀释孔中吸取部分液体回稀释液孔;
- 4) 从样本孔中吸取样本加入稀释液孔中,将样本进行稀释,稀释倍数为 1 ~ 10 倍;
- 5) 从稀释液孔中吸取液体加入稀释孔中,将样本进行进一步的稀释,稀释倍数为 1 ~ 100 倍;
- 6) 从稀释孔中吸取液体加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,孵育 30 ~ 60min;
- 7) 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体;
- 8) 从酶结合物孔中吸取酶结合物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 30 ~ 60min 后移除液体;
- 9) 重复步骤 7);
- 10) 从底物孔中吸取底物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 10 ~ 20min;
- 11) 从终止液孔中吸取终止液加入反应孔中,1 ~ 10min 内于 450nm 读取 OD 值,或选择双波长法测定,波长范围在 620nm ~ 690nm。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述的方法包括如下的步骤:

- 1) 在所述的样本孔中加入样本 80 ~ 150 μL ;
- 2) 用精密加液器从稀释液孔中吸取 360 μL 液体到稀释孔中;
- 3) 移除稀释液孔中的剩余液体,从稀释孔中吸取 180 μL 液体回稀释液孔;
- 4) 用精密加液器从样本孔中吸取 20 μL 液体到稀释液孔中,样本 10 倍稀释;
- 5) 用精密加液器从稀释液孔中吸取液体 20 μL 到稀释孔中,样本 100 倍稀释;
- 6) 用精密加液器从稀释液孔中吸取液体 100 μL 到反应孔中,25 ~ 37℃下,孵育 60min 后移除液体;
- 7) 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体;
- 8) 用精密加液器从酶结合物孔中吸取 100 μL 辣根过氧化物酶标记的抗体酶结合物溶液至反应孔进行反应,25 ~ 37℃下,反应 30min 后移除液体;
- 9) 重复步骤 7);
- 10) 用精密加液器从底物孔中吸取 100 μL 的 TMB 底物溶液至反应孔中反应 10 ~ 15min;
- 11) 用精密加液器从终止液孔中吸取 100 μL 的终止液加注至反应孔中,1 ~ 10min 内于 450nm 和 630nm 双波长条件下进行检测,读取 OD 值。

一种检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置及其方法

技术领域

[0001] 本发明申请涉及一种检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置及其方法,属于临床免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 原发性多发性肌炎是一种全身性疾病,通常隐袭起病,在数周、数月、数年内缓慢进展,病人可有晨僵、乏力、食欲不振、体重减轻、发热、关节疼痛,少数病人有雷诺现象。该病的发病率每年可达到百万人,男女发病率比例为 1 : 3,发病年龄多在 10 ~ 14 岁或 45 ~ 50 岁两个阶段。

[0003] Jo-1 抗体是组氨酰-tRNA 合成酶抗体中的一种。这种胞质酶催化组氨酸和 tRNA 的酯化反应,其在胞质内以同源二聚体形式存在,亚基分子量约为 50kD。Jo-1 的抗原决定簇位与 N 端,为约 32 个氨基酸具有螺旋结构的区域。Jo-1 抗体极少在非肌炎患者中查及。有证据证明 Jo-1 抗体与 MHC II 类基因有关,且抗体滴度随疾病活动程度提示机体产生 Jo-1 的应答反应与肌炎的发病机制有某种关联。

[0004] 临床检测抗 Jo-1 抗体的常用方法包括免疫印迹法、免疫双扩散法、间接免疫荧光法、酶联免疫吸附试验的方法,但这些方法都存在着不足之处。

[0005] 一、免疫印迹法

[0006] 免疫印迹是将蛋白质转移到膜上,然后利用抗体进行检测。对已知表达蛋白,可用相应抗体作为一抗进行检测,对新基因的表达产物,可通过融合部分的抗体检测。其不足之处在于:

[0007] (1) 只能进行定性和半定量分析,无法得出被检物质具体的量。

[0008] (2) 操作步骤繁琐,试验用时较长。

[0009] (3) 检测的灵敏度还有待提高。

[0010] 二、免疫双扩散法

[0011] 免疫双扩散法是抗原与抗体分子在凝胶空间网络内自由扩散,当其相遇时,在比例合适处会形成免疫复合物沉淀线。该方法不用很多的特殊仪器,价格低廉,特异性高。但其操作费时费力,需要用肉眼来观察沉淀环,结果灵敏度低,判断不客观,对实验室技术人员的技术水平和经验要求较高,不同操作人员甚至是同一操作人员不同次操作结果的一致性较差。

[0012] 三、间接免疫荧光法

[0013] 该法的基本原理是用特异性的抗体与载玻片中的抗原结合后形成抗原抗体复合物,继用荧光抗体与抗原抗体复合物结合,形成抗原抗体荧光复合物。在荧光显微镜下,根据复合物的发光情况来确定所检测的抗体。该方法评价:由于结合在抗原抗体复合物上的荧光抗体增多,发出的荧光亮度强,因而其敏感性强。但是其不足也是明显的:

[0014] (1) 在分析结果时无法根据分子量的大小区分非特异性识别;

[0015] (2) 操作相对复杂,需要价格较昂贵的荧光显微镜,在很多基层医院难以推广,也

不太适用于标本量较多的实验室；

[0016] (3) 荧光测定中的本底较高, 荧光免疫技术用于定量测定有一定困难；

[0017] (4) 结果判定需要有经验的专业人员, 分析结果的客观性不足；

[0018] (5) 只能进行定性检测, 不能进行定量测定。

[0019] 四、酶联免疫吸附法

[0020] 酶联免疫吸附法 (ELISA) 被广泛应用于检测抗 Jo-1 抗体, 但该方法也存在着下述的不足之处：

[0021] (1) 使用 12×8 型、6×8 型、8×12 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；

[0022] (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；

[0023] (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；

[0024] (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；

[0025] (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；

[0026] (6) 在检测项目成套试剂的数量配置及使用上均为项目数 × 48/96 人份, 如果需要检测 10 个项目, 则试剂的配置及使用数须为 10×48/96 人份, 如果只有一份样本需要检测 10 个不同的项目, 也需要配置 10×48/96 人份的试剂, 存在着不够经济合理的缺点。

发明内容

[0027] 本发明专利申请即是针对目前对于抗 Jo-1 抗体的检测中存在的上述不足之处, 提供一种能够进行独立单人份检测的试剂装置及其检测方法。

[0028] 本发明专利申请基于酶联免疫检测的原理来实现抗 Jo-1 抗体的检测, 是一种独立的、单人份的、一次性的检验方法；进一步的, 本发明申请还提供了与该方法配套的相应的试剂装置, 该试剂装置将抗 Jo-1 抗体酶联免疫检测所需要的多种试剂盛装在一个独立的、多孔结构的试剂装置内, 通过分步加注移弃完成检测步骤；进一步的, 所述的试剂装置还可以通过专用的免疫分析仪进行相应的全自动检测。

[0029] 本发明申请的目的之一是提供一种检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置, 该目的是通过下述的技术方案实现的：

[0030] 具体来说, 本发明申请所述的检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置为长条状, 包括具有八个孔位的基体和位于基体一端的手柄, 八个孔位的排列顺序从近手柄端开始依次为样本孔、辅剂孔、酶结合物孔、底物孔、终止液孔、稀释液孔、反应孔和稀释孔, 样本孔内盛有待测样本, 辅剂孔供检测有需要时加入辅助试剂使用, 酶结合物孔内盛有酶结合物溶液, 底物孔内盛有底物溶液, 终止液孔内盛有终止液, 稀释液孔内盛有稀释液, 反应孔为平底且具有高

的光通透性,孔内包被有 Jo-1 抗原,并作为反应容器加注待测的液体样本和检测试剂及洗涤液,反应终止后进行吸光度测定,稀释孔作为样本稀释容器,供稀释样本时用。

[0031] 进一步的,所述的试剂装置中,辅剂孔、酶结合物孔、底物孔、终止液孔和稀释液孔上覆盖有密封薄膜,该密封薄膜主要起到在运输和移动的过程中防止液体溢出的作用,另外,也起到防尘防污染及增强稳定性的作用。

[0032] 进一步的,所述的手柄上粘贴有条形码,该条形码标识有抗 Jo-1 抗体检测试剂及分析装置的相关信息。

[0033] 更进一步的,所述的信息包括检测项目代码、检测试剂生产批号、试剂有效期、定量检测标准曲线参数、酶联免疫反应类型、试剂及分析装置的序列号等。

[0034] 进一步的,所述试剂装置还包括若干个支撑柱,所述的支撑柱位于所述试剂装置基体的下面,相邻支撑柱之间间隔有一个以上的孔位,支撑柱的作用是为了加强基体的机械强度及平衡性。

[0035] 进一步的,所述试剂装置中反应孔由外孔和内孔构成,外孔的底部开有底孔,内孔穿过底孔且与底孔紧配合,外孔和内孔之间留有防溢腔,防溢腔的作用是在反应过程中,如果液体溢出,可以留在腔内,防止污染仪器和其他试剂装置。

[0036] 更进一步的,所述试剂装置中反应孔的内孔包被的 Jo-1 抗原包括牛胸腺 Jo-1、小鼠 Jo-1、兔 Jo-1 或重组人 Jo-1、。

[0037] 应该明确的是,本发明申请中,所述试剂装置中各孔位的大小、形状并不加以限制,例如各孔位的开口缘可为方形或圆形,其剖面的形状也可以是方形、“U”型、或“V”型,但对于反应孔来说,为了获得较好的光通透性,底部应为平底。

[0038] 进一步的,所述的样本孔内加入的样本为待测血清或血浆,加入的量根据样本孔的大小和检测需要稀释的倍数来确定。

[0039] 所述的辅剂孔是在必要的时候加入辅助试剂之用,例如吸附剂、中和剂、抑制剂、缓冲液等,以去除检测过程中其他物质对检测反应及结果的干扰。

[0040] 所述的酶结合物孔内加入酶结合物溶液,主要成份为辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG、或 IgA、或 IgM、或 Ig (GAM) 抗体,碱性磷酸酶标记的抗人 IgG、或 IgA、或 IgM、或 Ig (GAM) 抗体,葡萄糖氧化物酶标记的抗人 IgG、或 IgA、或 IgM、或 Ig (GAM) 抗体,或 β -半乳糖苷酶标记的抗人 IgG、或 IgA、或 IgM、或 Ig (GAM) 抗体。

[0041] 所述的底物孔中加入的底物溶液主要成份为 TMB、OPD 或 ABTS。

[0042] TMB 作为一种新型安全的色原试剂,已逐步取代强致癌物联苯胺和其他致癌性的联苯胺衍生物,应用于临床化验、法医检验、刑事侦破及环境监测等领域,尤其是在临床生化检验方面,TMB 作为过氧化物酶的新底物,在酶免疫分析法 (EIA) 和酶联免疫吸附检验法 (ELISA) 中获得了广泛的应用。

[0043] 所述的终止液孔中加入的终止液主要成份为浓度是 0.1 ~ 0.5M 的硫酸或盐酸溶液。

[0044] 所述的稀释液孔中加入的稀释液主要成份为磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、硼酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液,并含一定浓度的牛血清白蛋白、叠氮化钠等组份,用于排除样本中小分子物质的非特异性反应的干扰及增加稳定性。

[0045] 本发明申请的另一个目的是提供利用上述试剂装置进行抗 Jo-1 抗体的检测方

法,所述的方法包括如下的步骤:

- [0046] 1) 在所述的样本孔中加入未稀释的样本;
- [0047] 2) 从稀释液孔中吸取稀释液加入稀释孔中;
- [0048] 3) 移除稀释液孔中的剩余液体,从稀释孔中吸取部分液体回稀释液孔;
- [0049] 4) 从样本孔中吸取样本加入稀释液孔中,将样本进行稀释;
- [0050] 5) 从稀释液孔中吸取液体加入稀释孔中,将样本进行进一步的稀释;
- [0051] 6) 从稀释孔中吸取液体加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,孵育 30 ~ 60min;
- [0052] 7) 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体;
- [0053] 8) 从酶结合物孔中吸取酶结合物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 30 ~ 60min 后移除液体;
- [0054] 9) 重复步骤 7);
- [0055] 10) 从底物孔中吸取底物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 10 ~ 20min;
- [0056] 11) 从终止液孔中吸取终止液加注至反应孔中,1 ~ 10min 内于 450nm 读取 OD 值,或选择双波长法测定,波长范围在 620nm ~ 690nm。

[0057] 进一步的,所述的方法包括如下的步骤:

- [0058] 1) 在所述的样本孔中加入未稀释的样本,体积至少为样本孔容量的 1/4;
- [0059] 2) 从稀释液孔中吸取稀释液加入稀释孔中,吸取的量为孔内液体总量的 7/10 以上;
- [0060] 3) 移除稀释液孔中的剩余液体,根据预期稀释倍数从稀释孔中吸取部分液体回稀释液孔;
- [0061] 4) 从样本孔中吸取样本加入稀释液孔中,将样本进行稀释,稀释倍数为 1 ~ 10 倍;
- [0062] 5) 从稀释液孔中吸取液体加入稀释孔中,将样本进行进一步的稀释,稀释倍数为 1 ~ 100 倍;
- [0063] 6) 从稀释孔中吸取液体加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,孵育 30 ~ 60min;
- [0064] 7) 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体;
- [0065] 8) 从酶结合物孔中吸取酶结合物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 30 ~ 60min 后移除液体;
- [0066] 9) 重复步骤 7);
- [0067] 10) 从底物孔中吸取底物溶液加入反应孔中,25 ~ 37℃的条件下,反应 10 ~ 20min;
- [0068] 11) 从终止液孔中吸取终止液加入反应孔中,1 ~ 10min 内于 450nm 读取 OD 值,或选择双波长法测定,波长范围在 620nm ~ 690nm。

[0069] 更进一步的,所述的方法包括如下的步骤:

- [0070] 1) 在所述的样本孔中加入样本 80 ~ 150 μ L;
- [0071] 2) 用精密加液器从稀释液孔中吸取 360 μ L 液体到稀释孔中;
- [0072] 3) 移除稀释液孔中的剩余液体,从稀释孔中吸取 180 μ L 液体回稀释液孔;
- [0073] 4) 用精密加液器从样本孔中吸取 20 μ L 液体到稀释液孔中,样本 10 倍稀释;

- [0074] 5) 用精密加液器从稀释液孔中吸取液体 20 μ L 到稀释孔中, 样本 100 倍稀释;
- [0075] 6) 用精密加液器从稀释液孔中吸取液体 100 μ L 到反应孔中, 25 ~ 37 $^{\circ}$ C 下, 孵育 60min 后移除液体;
- [0076] 7) 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体;
- [0077] 8) 用精密加液器从酶结合物孔中吸取 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗体酶结合物溶液至反应孔进行反应, 25 ~ 37 $^{\circ}$ C 下, 反应 30min 后移除液体;
- [0078] 9) 重复步骤 7);
- [0079] 10) 用精密加液器从底物孔中吸取 100 μ L 的 TMB 底物溶液至反应孔中反应 10 ~ 15min;
- [0080] 11) 用精密加液器从终止液孔中吸取 100 μ L 的终止液加注至反应孔中, 1 ~ 10min 内于 450nm 和 630nm 双波长条件下进行检测, 读取 OD 值。
- [0081] 所述的洗涤液包括 PBST 溶液, PBST 溶液是指 PBS 溶液加上 Tween-20, PBS 溶液是指磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution), 渗透压近似于生理条件, 又有很强的 pH 缓冲能力, 常用来洗细胞和作为细胞培养的基础液, 而 Tween-20 为一种非离子表面活性剂, 对细胞生长可产生影响, Tween-20 有复性抗原的作用, 可提高特异性的识别能力。
- [0082] 本发明申请所述测定抗 Jo-1 抗体的试剂装置及其方法, 不但具有其他检测方法所具有的特异性强、灵敏度高、准确性好、成本较低、使用要求不高、操作较为简便、获得检测结果时间短、应用广泛等的优点, 而且解决了其他检测方法的诸多不足, 具体体现在以下几个方面:
- [0083] 1. 所述的检测方法运用酶联免疫分析原理, 利用特定的分析仪器, 采用配套专用的检测试剂盒及分析试剂装置, 自动实现抗 Jo-1 抗体定量测定, 是一种全新的、适用的、实用的、高效的、快速的检测抗 Jo-1 抗体的方案;
- [0084] 2. 它是一种独立的、单人份的检测试剂及分析装置, 无需像通用 ELISA 法那样使用 12 $\times$ 8 型、6 $\times$ 8 型、8 $\times$ 12 型或整板型 96 孔专用酶联免疫微孔板作为抗原包被用品和反应容器, 在使用时只要有一份样本即可进行对应项目的检测而无试剂的浪费, 如果样本的数量超过一份, 按实际样本数使用该试剂及分析装置即可;
- [0085] 3. 它将每一检测必需的试剂盛装在一个分析试剂装置的试剂孔位内, 而无须将检测试剂分别用不同的试剂瓶来盛装, 不但操作极为简便, 而且不容易造成操作差错, 从而保证检测结果的正确性;
- [0086] 4. 它对每一个分析试剂装置都有一个专用条形码, 条形码的数值包含检测所对应的检测项目代码、检测试剂生产批号、试剂有效期、定量测定标准曲线参数、具体的酶联免疫反应类型、试剂及分析装置的序列号等信息, 不能随意被改变, 使用时严格受控, 尤其是在使用超过有效期检测试剂时, 将被识别并阻止发出检测报告, 从而可以确保检测的准确性;
- [0087] 5. 它将每一检测试剂进行有效分隔和密封, 不会引起各种试剂之间的交叉污染而影响检测结果;
- [0088] 6. 它是一种专用于特定分析仪器的分析试剂装置, 在检测过程中用全自动的精密加液器来加注检测试剂、洗涤液或样本, 操作自动化, 加量精确, 检测结果的准确度和精密度高;

[0089] 7. 在检测项目成套试剂的数量配置及使用上,一切按实际使用需要进行配备即可,尤其是在对多项目检测上,配备更为适量,不会出现超配置及使用情况。

附图说明

[0090] 图 1 是本发明申请所述试剂装置的一个实施例的剖面结构示意图;

[0091] 图 2 是图 1 所述实施例的平面俯视图;

[0092] 图 3 是本发明申请所述试剂装置的另一个实施例的剖面结构示意图;

[0093] 图 4 是本发明申请所述试剂装置的再一个实施例中反应孔的平面俯视图;

[0094] 图 5 和图 6 是图 4 所述试剂装置中反应孔中内孔和外孔的装配示意图;

[0095] 其中,10 为基体、20 为手柄、30 为条形码、40 为密封薄膜、50 为支撑柱、11 为样本孔、12 为辅剂孔、13 为酶结合物孔、14 为底物孔、15 为终止液孔、16 为稀释液孔、17 为反应孔、18 为稀释孔、171 为外孔、172 为内孔、173 为防溢腔、174 为底孔。

具体实施方式

[0096] 以下结合具体的检测装置与实施步骤对本发明申请所述的试剂装置和检测方法进行进一步的描述,目的是为了公众更好的理解本发明申请所述的技术方案,而不是对所述技术方案的限制。事实上,以相同或近似的原理,对所述试剂装置进行的改进,包括其形状、尺寸、所用材质的改变,以及相应结构的增减或替换,都在本发明申请所要求保护的技术方案之内。

[0097] 实施例一检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置一

[0098] 如图 1-2 所示,本发明申请所述的检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置为长条状,包括具有八个孔位的基体 10 和位于基体 10 一端的手柄 20,八个孔位的排列顺序从近手柄 10 端开始依次为样本孔 11、辅剂孔 12、酶结合物孔 13、底物孔 14、终止液孔 15、稀释液孔 16、反应孔 17 和稀释孔 18,所述的样本孔 11 内盛有待测样本,辅剂孔 12 供检测需要时加入辅助试剂使用,在本发明申请所述的检测方法中辅剂孔 12 内未加入任何试剂,酶结合物孔 13 内加入酶结合物溶液,底物孔 14 内加入底物溶液,终止液孔 15 加入终止液,稀释液孔 16 内加入稀释液,反应孔 17 为平底并具有很高的光通透性,当盛装无色或空白试剂溶液时,对可见光或紫外光或荧光的吸光度值接近于零,孔内已包被有重组人 Jo-1 抗原,并作为反应容器加注待测的液体样本和检测试剂及洗涤液,反应终止后进行吸光度测定,稀释孔 18 作为样本稀释容器,供稀释样本时用。

[0099] 进一步的,所述的试剂装置中,辅剂孔 12、酶结合物孔 13、底物孔 14、终止液孔 15 和稀释液孔 16 上覆盖有密封薄膜 40,该密封薄膜 40 主要起到在运输和移动的过程中,防止液体溢出的作用,另外,也起到防尘防污染及增加稳定性的作用。

[0100] 进一步的,所述的手柄 20 上粘贴有条形码 30,该条形码 30 标识有抗 Jo-1 抗体检测试剂及分析装置的信息,所述的信息包括检测项目代码、检测试剂生产批号、试剂有效期、定量检测标准曲线参数、酶联免疫反应类型、试剂及分析装置的序列号。

[0101] 实施例二检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置二

[0102] 如图 3 所示,本实施例中的检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置,其基本结构与实施例一中的试剂装置相同,在所述试剂装置还包括若干个支撑柱 50,所述的支撑柱 50 位于所述试

剂装置中基体 10 的下面,相邻支撑柱 50 之间间隔有一个以上的孔位,支撑柱 50 的作用是为了加强基体的机械强度及平衡性。

[0103] 实施例三检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置三

[0104] 如图 4-6 所示,为本发明申请所述检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置的优选的实施例,其基本结构与实施例一或实施例二相同,区别在于反应孔 17 为可拆卸式的结构,反应孔 17 由外孔 171 和内孔 172 构成,外孔 171 的底部开有底孔 174,内孔 172 穿过底孔 174 且与底孔 174 紧配合,外孔 171 和内孔 172 之间留有防溢腔 173,防溢腔 173 的作用是在反应过程中,如果液体溢出,可以留在腔内,防止污染仪器和其他试剂装置。

[0105] 进一步的,所述内孔和外孔的配合固定方式还可以是将内孔的外壁设计为两段,上段外壁的厚度大于下段外壁的厚度,外孔的底孔的直径与内孔下段的外径相等,这样将内孔下段插入底孔中,内孔的上段恰好卡在底孔之上,同样可以起到紧固的效果。

[0106] 实施例四试剂装置或试剂盒的制作 - 间接法检测抗 Jo-1 抗体

[0107] 本发明是基于酶联免疫检测技术上的一种更加简单、准确、有效的一套方法,其采用的基本原理为间接酶联免疫法:将由重组人 Jo-1 组成的抗原吸附于固相上,通过孵育使稀释的人血清或血浆中的特异性抗体与抗原结合,洗涤去除未与固相结合抗体,加入用辣根过氧化物酶标记的抗人免疫球蛋白酶联物,孵育,去除未结合的酶联物,加入酶色原底物,产生的颜色与检测样本中的特异性抗体浓度成正比。这种方法主要是通过用于酶联免疫检测的分析试剂装置和配套试剂来实现抗 Jo-1 抗体的免疫检测。通过这种酶联免疫方法,同时运用特定分析仪器的分析试剂装置和试剂,可快速、准确的做出判断用于辅助临床诊断。

[0108] 以孔位 11 作为样本孔,在使用时加入液体样本,供检测时取用;

[0109] 以孔位 12 作为辅剂孔,用密封薄膜封口,供检测备用;

[0110] 以孔位 13 作为酶结合物孔,加入酶结合物溶液用密封薄膜封口,供检测时取用;

[0111] 以孔位 14 作为底物孔,加入 TMB 底物溶液后用密封薄膜封口,供检测时用;

[0112] 以孔位 15 作为终止液孔,加入终止液后用密封薄膜封口,供检测时用;

[0113] 以孔位 16 作为稀释液孔,加入样本稀释液后用密封薄膜封口,供检测时用;

[0114] 以孔位 17 作为包被物孔 / 反应孔 / 比色孔,已包被有重组人 Jo-1 组成的抗原,并作为反应容器加注待测的液体样本和检测试剂及洗涤液,反应终止后进行吸光度测定;

[0115] 以孔位 18 作为稀释孔,供稀释样本时用;

[0116] 在手柄 20 粘贴有抗 Jo-1 抗体检测试剂及分析装置信息的条形码 30,该条形码包括检测项目代码、检测试剂生产批号、试剂有效期、定量测定标准曲线参数、酶联免疫反应类型、试剂及分析装置的序列号。

[0117] 按照上述方法制备若干分析装置,另外制备相应的校准品和质控物。这样即构成了完整的抗 Jo-1 抗体测定试剂盒组份。将检测抗 Jo-1 抗体的试剂装置及配套使用组份装入试剂盒的外包装盒,即制成检测抗 Jo-1 抗体试剂盒。

[0118] 实施例五抗 Jo-1 抗体 IgG 的检测方法

[0119] 本发明申请提供一种利用上述试剂装置进行抗 Jo-1 抗体 IgG 检测的方法,所述的方法包括如下的步骤:

[0120] 1. 在所述的样本孔中加入样本 80 ~ 150 μ L;

- [0121] 2. 用精密加液器从稀释液孔中吸取 360 μ L 液体到稀释孔中；
- [0122] 3. 移除稀释液孔中的剩余液体，从稀释孔中吸取 180 μ L 液体回稀释液孔；
- [0123] 4. 用精密加液器从样本孔中吸取 20 μ L 液体到稀释液孔中，样本 10 倍稀释；
- [0124] 5. 用精密加液器从稀释液孔中吸取液体 20 μ L 到稀释孔中，样本 100 倍稀释；
- [0125] 6. 用精密加液器从稀释液孔中吸取液体 100 μ L 到反应孔中，25℃下，孵育 60min 后移除液体；
- [0126] 7. 用洗涤液对反应孔进行 3 ~ 5 次洗涤后移除液体；
- [0127] 8. 用精密加液器从酶结合物孔中吸取 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体酶结合物溶液至反应孔进行反应，25℃下，反应 30min 后移除液体；
- [0128] 9. 重复步骤 7；
- [0129] 10. 用精密加液器从底物孔中吸取 100 μ L 的 TMB 底物溶液至反应孔中反应 10 ~ 15min；
- [0130] 11. 用精密加液器从终止液孔中吸取 100 μ L 的终止液加注至反应孔中，1 ~ 10min 内于 450nm 和 630nm 双波长条件下进行检测，读取 OD 值。

[0131] 实施例六通过全自动分析仪实现对样本中抗 Jo-1 抗体 IgG 检测的分析操作流程

[0132] 进一步的，本发明申请所述的检测方法还包括相应配合使用的全自动分析仪，该全自动分析仪包括一个分析装置托盘，它是与分析装置的形状相配套的，一共有 30 个位置可供分析装置放置，用于检测分析，此外还包括模块式集成机械电子结构及软件控制系统，可实现自动化的加注、稀释、孵育、洗涤、读数、分析过程。每个位置独立定量分析，保证结果的准确性。仪器运行后，分析装置托盘会自行转动到不同的位置进行加注，稀释，孵育，洗涤以及读数的步骤。

[0133] 具体的操作包括如下的步骤：

[0134] (1) 检查程序的准备：按要求配置好相应的溶液，包括洗涤缓冲液，清洗液或消毒液，配制完毕装入相应的液体瓶中；

[0135] (2) 与外接计算机相连：仪器和外接计算机相连，从而将仪器正常工作所得结果交由集中式系统处理；

[0136] (3) 开机：打开仪器开关后，通过外接计算机的工作界面对仪器设置自动或手动自检，从而为仪器的正常运行做准备；

[0137] (4) 预热：在开机后，仪器会启动加热程序，将温度调至待检温度；

[0138] (5) 冲洗检查；

[0139] (6) 抗 Jo-1 抗体 IgG 的检测：

[0140] 1) 从有密封口的一边打开包装袋，取用所需数量的分析试剂装置，排除空气后将袋口封紧；

[0141] 2) 检查分析试剂装置 TMB 底物孔中的溶液，应无色泽改变，否则应弃掉；

[0142] 3) 分别在每个分析试剂装置的样本孔中加 50 ~ 120 μ L 未稀释的样本，建议加 100 μ L 的样本，每更换一个批号的试剂，应取其中一个分析试剂装置及校准品进行仪器校准；

[0143] 4) 按照所需检测的数量在分析装置托盘中放入相对应数量的分析试剂装置，点击“开始”、“扫描”，仪器可自动地扫描分析试剂装置条码、质控物条码和校准品条码，然后对

样本进行编号,或通过外部条码扫描仪对样本条码进行扫描;

[0144] 5) 点击“运行”,仪器根据条码信息自动运行,根据条码,程序首先检测校准品,通过校准,修正标准曲线;其次对质控物进行检测,如果其检测结果在标示的范围内,则表示检测的标准曲线符合要求,可用于样本的检测,最后开始样本的检测程序;

[0145] 6) 稀释:加注针刺破孔位密封薄膜自动吸取稀释液 360 μ L 到稀释孔中,并移除稀释液孔中的剩余液体,再从稀释孔中吸取稀释液 180 μ L 回稀释液孔,加注针从样本孔自动吸取样品 20 μ L 到稀释液孔进行样本稀释,再从稀释液孔中吸取 20 μ L 到稀释孔,动作完成后,被稀释的样本被加注针移至反应孔孵育 30 ~ 60min,通常仪器设定为 60min,之后移除液体;

[0146] 7) 洗涤:冲洗针从相应的液瓶中吸取一定量的洗涤缓冲液对试剂孔进行三到五次洗涤后移除液体;

[0147] 8) 加注针刺破酶结合物孔密封薄膜吸取 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体酶结合物溶液至反应孔进行反应,反应 30 ~ 60min 后移除液体,通常仪器设定为 30min;

[0148] 9) 重复步骤 7);

[0149] 10) 加注针刺破 TMB 底物孔密封薄膜吸取 100 μ L 的 TMB 底物溶液至反应孔反应 10 ~ 20min,通常仪器设定为 10min;

[0150] 11) 加注针刺破终止液孔密封薄膜吸取 100 μ L 的终止液加注至反应孔,在 1 ~ 10min 内于 450nm/630nm 双波长下读取 OD 值。

[0151] (7) 检测结果:当检测程序运行完毕,可通过计算机上的数据处理软件分析,最后生成报告单以便查阅;

[0152] (8) 关机:检测结束后,在仪器关机前,必须启动清洗循环,这样可以避免来自溶液中的残留盐份在液路中结晶,避免损坏仪器或导致检测结果无效,清洗完成后,仪器电源自动关闭。

[0153] 实施例七患者样本中抗 Jo-1 抗体 IgG 的检测应用、结果分析以及检测的质控

[0154] 采用实施例五的操作方法与程序,使用实施例四所述的试剂盒,可用于定量测定人血清或血浆中的抗 Jo-1 抗体 IgG 水平。

[0155] Jo-1 抗体是肌炎诊断以及疗效观察的一项有意义的指标,有时也是早期诊断伴发肺纤维化的一个指标。20% ~ 40% 多发性肌炎患者 Jo-1 抗体阳性。可根据检测的结果来辅助临床诊断,初步判断患者患病的情况,最终确诊应结合临床表现或其他诊断方法/指标进行综合考虑。

[0156] 以下为检测结果的分析:

[0157] (1) 参考值(参考范围)

[0158] 正常参考值:0 ~ 15AU/mL;检测一定数量(具有统计学意义)的阴性样本,结果的平均值加 3 倍标准偏差(即 $\bar{x} + 3SD$) 为参考值的上限。

[0159] 各实验室可根据实际情况建立适宜的参考范围。

[0160] (2) 检测结果的解释

[0161] 若样本值 > 15AU/mL,提示抗体水平升高,但应结合临床表现或其他诊断方法/指标进行确诊。

[0162] 为了方便临床应用,可参考如下判断规则:

[0163] 样本值 < 12AU/mL 阴性

[0164] 12AU/mL ≤ 样本值 ≤ 18AU/mL 可疑

[0165] 样本值 > 18AU/mL 阳性

[0166] 当检测结果为可疑时,应重新检测,若仍为可疑,需在 2 ~ 3 周后重新采集样本检测。

[0167] 以下是将实施例六的检测过程重复检测阳性和阴性质控血清,检查结果的再现性,获得如下的结果:

[0168]

阳性质控物						
编号	检测值	结果		编号	检测值	结果
1	56.5	P		6	63.3	P
2	50.2	P		7	56.8	P
3	52.7	P		8	54.6	P
4	49.4	P		9	61.7	P
5	58.1	P		10	57.9	P
测定结果均值为 56.1 AU/mL, CV%=8.1%						
阴性质控物						
1	8.1	N		6	8.6	N
2	7.9	N		7	7.1	N
3	8.3	N		8	8.4	N
4	9.4	N		9	8.5	N
5	7.2	N		10	7.4	N
测定结果均值为 8.1 AU/mL, CV%=8.8%						

[0169] 按照本发明,可通过相同的分析过程同时全自动进行多份样本的抗 Jo-1 抗体的检测,并且还可与其他相关联或不相关联项目同时检测,这就使检测更简化、成本降低、检测时间缩短、不易发生交叉污染、检测操作容易进行;且检测的特异性强、灵敏度高、准确性好。

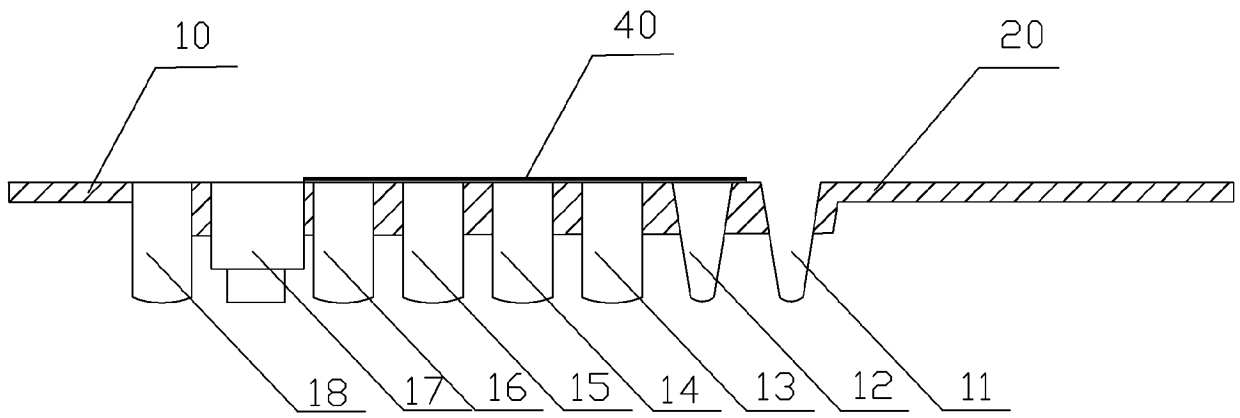


图 1

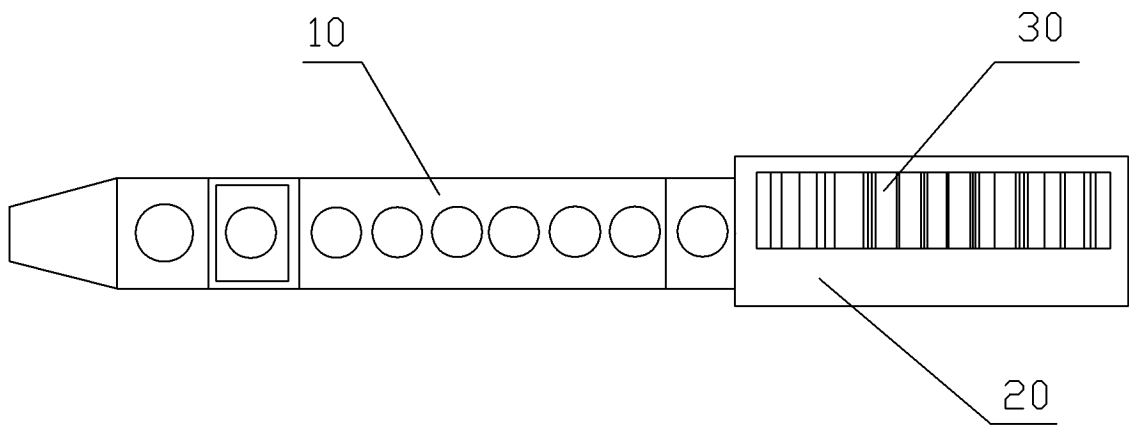


图 2

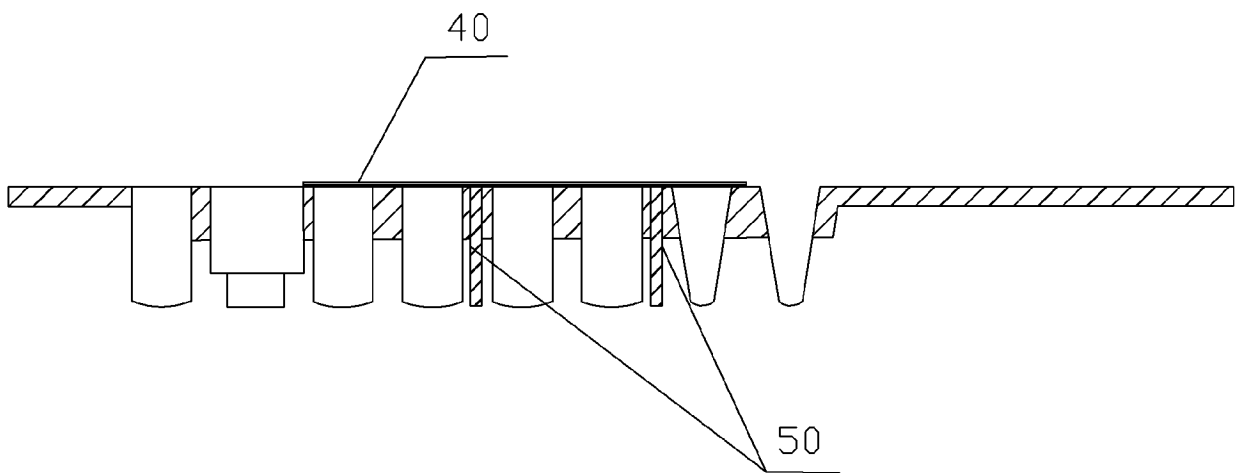


图 3

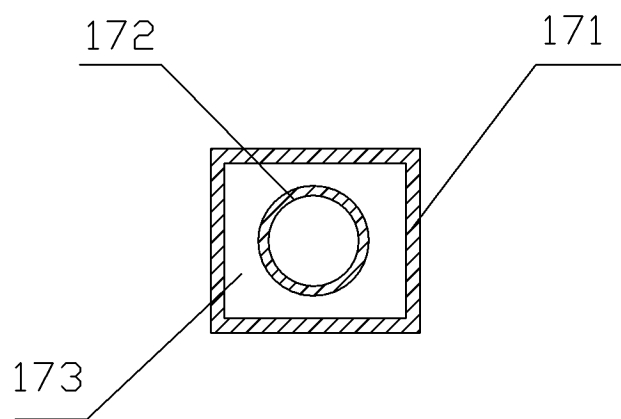


图 4

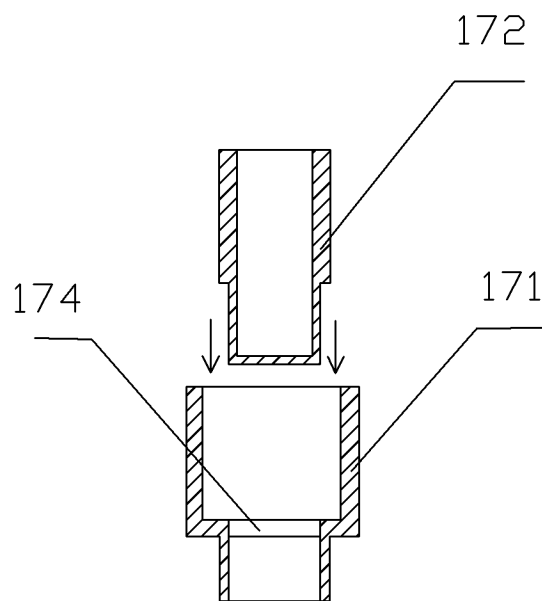


图 5

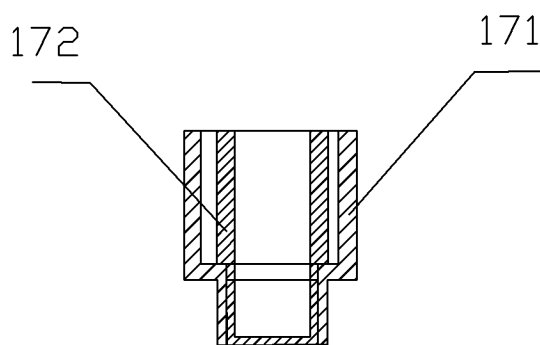


图 6

专利名称(译)	一种检测抗Jo-1抗体的试剂装置及其方法		
公开(公告)号	CN103185777A	公开(公告)日	2013-07-03
申请号	CN201110453951.0	申请日	2011-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙科技股份有限公司		
[标]发明人	胡德明 刘清波 何林 阳辉		
发明人	胡德明 刘清波 何林 阳辉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/31		
代理人(译)	胡坚		
其他公开文献	CN103185777B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明申请公开一种检测抗Jo-1抗体的试剂装置及其方法，所述的试剂装置为长条状，包括具有八个孔位的基体和位于基体一端的手柄，八个孔位的排列顺序从近手柄端开始依次为样本孔、辅剂孔、酶结合物孔、底物孔、终止液孔、稀释液孔、反应孔和稀释孔。本发明申请基于酶联免疫检测的原理，利用上述的试剂装置对抗Jo-1抗体进行检测，是一种独立的、单人份的分析检测方法，并且可以与相应的特定分析仪器配合使用，在检测过程中，用全自动的精密加液器来加注检测试剂或样本，具有操作自动化，加量精确，检测结果的准确度和精密度高的优点，具有广阔的应用前景。

