



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106324254 A

(43)申请公布日 2017.01.11

(21)申请号 201610672237.3

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2016.08.12

(71)申请人 泰州泽成生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城
泰路西侧、陆家路东侧G59幢62号西半
侧一至四层

(72)发明人 季连星 刘振国 王赞 孙裔雷
孔晓凯 丁文健 夏振伟

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 刘刚

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

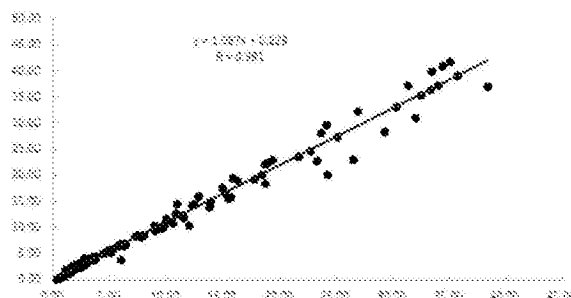
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种抗胰岛素抗体检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗胰岛素抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,包括荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液、碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、IAA校准品和发光底物溶液。本发明将磁微粒技术和化学发光技术相结合,提供了一种趋于均相的反应体系。本发明将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,并且采用了一步法反应模式,使得检测灵敏度、精密性大大提高、检测范围扩大,能够以更高准确度、特异性、精密度和更低成本对抗胰岛素抗体进行定量检测。



1. 一种抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,包括荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液、碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、IAA校准品和发光底物溶液。

2. 根据权利要求1所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II由碱性磷酸酶与胰岛素抗原通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成。

3. 根据权利要求2所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,所述荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液的工作浓度为0.8-1.2 $\mu\text{g}/\text{mI}$,PH为7~9;所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的工作浓度为0.5-0.8 $\mu\text{g}/\text{mI}$,PH为7~9。

4. 根据权利要求3所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,所述含荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液的制备过程如下:

(1)配制含有荧光素的PH为7~9的Tris-HCl缓冲液,所述Tris-HCl缓冲液中含有浓度4~8wt%的PEG-6000、0.7~0.9wt%的氯化钠、0.08~0.1wt%的叠氮钠、0.6wt%的PC-300、0.8~1wt%牛血清白蛋白和20mM/L EDTA;

(2)按照荧光素与胰岛素抗原I摩尔比为150:1的比例,将步骤(1)中Tris-HCl缓冲液与胰岛素抗原I混合,充分混匀,室温静置反应;

(3)将反应液通过凝胶柱分离未结合的荧光素,得到含有荧光素标记的胰岛素抗原I溶液,调浓度和PH值,即得到含荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液。

5. 根据权利要求3所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,所述含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的溶液的制备过程如下:

(1)使用二甲基亚砜溶剂将胰岛素抗原II溶解,保持胰岛素抗原II的终浓度为30-60mg/mI,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2-3小时;使用二甲基亚砜溶剂将胰岛素抗原II与辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接物1:10稀释,置2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用;

(2)按照碱性磷酸酶与(1)中连接物的摩尔比为1:2的量将碱性磷酸酶缓冲液与(1)中连接物混合均匀,室温放置反应1.5h,生成所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II;其中碱性磷酸酶缓冲液浓度为1-2mg/mI;

(3)将反应液通过G-25凝胶柱除盐,调整浓度和pH值。

6. 根据权利要求3所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液的制备过程如下:

在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应10-20h,磁分离,除上清液,调整浓度和pH,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;其中所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于0.5mmI;荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

7. 根据权利要求1所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒,其特征在于,所述发光底物溶液的制备过程如下:

取TRIS 2g、NaCl 6g、Na₂SO₃ 0.005g和ProClin-300 0.5mI于烧杯中,加入600mI纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节PH至7.5;加200mI发光底物,用0.2 μm 滤器过滤,纯化水定容至1000mI,混匀即得所述底物;其中,发光底物选自金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯中的一种或多种。

8. 采用权利要求1-7中任一项权利要求所述的抗胰岛素抗体检测试剂盒用于对抗胰岛

素抗体定量检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)免疫反应:在反应管中加入待检测样本,并依次加入含荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液、含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的溶液,混匀,20-40℃下温育30min;加入包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液,混匀,20-40℃下温育30min,获得双抗原夹心复合物,并将双抗原夹心复合物固定在磁性微球上;

(2)洗涤:加清洗液,震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除上清,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复步骤3-5次;

(3)加底物检测:在反应管中加入发光底物溶液,充分混匀,检测发光值,计算得到抗胰岛素抗体的含量。

一种抗胰岛素抗体检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗胰岛素抗体领域,具体涉及一种结合了免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术的抗胰岛素抗体磁微粒化学发光检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 人胰岛素抗体常存在于接受异源性胰源素治疗的糖尿病病人血清中,这种抗体能结合胰岛素形成复合物,使胰岛素失活,这是糖尿病病人对胰岛素抵抗的主要原因之一。现已证实5种Ig类型的抗胰岛素抗体都存在,但以IgG类为主。胰岛素抗体的出现有两种类型,一种出现在接受过外源胰岛素治疗的病人,其抗胰岛素抗体的出现主要与使用的胰岛素制剂的纯度有关;另一种出现在从未接受过胰岛素治疗的病人血清,此类胰岛素抗体成为胰岛素自身抗体。胰岛素抗体在糖尿病、低血糖等疾病的诊断、治疗等方面具有重要的作用。因此,临床上病人血清中抗胰岛素抗体定量检测意义重大。

[0003] 目前抗胰岛素抗体检测方法多采用免疫学方法。免疫学检测技术利用抗原、抗体特异性反应原理检测机体内待测物质的技术。放射免疫检测、荧光免疫检测、酶联免疫检测及化学发光检测技术逐渐发展成熟,并逐步取代了传统的免疫沉淀、免疫凝聚等技术,免疫学检测技术的发展使临床检测检验发生了巨大的变化:可检测项目剧增、检测灵敏度和特异度更高,自动化程度增加。尤其是后期发展的化学发光免疫检测技术进一步提高了检测的灵敏度和特异度等检测性能,为疾病的定量检测、诊断、治疗提供了直观的资料。

[0004] 抗胰岛素抗体是医院开展的重要的检测项目,对糖尿病、低血糖等疾病的诊断具有无可替代的参考作用。目前我国批准上市的抗胰岛素抗体检测试剂多为国产,采用的检测方法学多为酶免和化学发光。

[0005] 酶免检测法在检测灵敏度、检测线性范围等方面远不及化学发光检测法。此外化学发光还具有底物危害小、有效期长、干扰因素少、自动化程度高等优势。因此,在面对成分复杂的临床待测样品,化学发光表现更胜一筹。

[0006] 磁微粒免疫检测技术是利用高分子材料合成的一定颗粒大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学形状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,使得某些特殊成分得以分离、浓缩或纯化。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种抗胰岛素抗体定量检测试剂盒,该试剂盒将磁分离技术和化学发光技术相结合,简单快速,结果准确;本发明的另一目的为提供该试剂盒的制备方法。

[0008] 为实现上述目的,本发明可采用下述技术方案:

[0009] 本发明的抗胰岛素抗体检测试剂盒,包括荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液、碱性

磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ的溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、IAA校准品和发光底物溶液。

[0010] 进一步的,所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ由碱性磷酸酶与胰岛素抗原通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成。

[0011] 进一步的,所述荧光素标记的胰岛素抗原Ⅰ的溶液的工作浓度为0.8-1.2 $\mu\text{g}/\text{mI}$,PH为7~9;所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ的工作浓度为0.5-0.8 $\mu\text{g}/\text{mI}$,PH为7~9。

[0012] 进一步的,所述含荧光素标记的胰岛素抗原Ⅰ的溶液的制备过程如下:

[0013] (1)配制含有荧光素的PH为7-9的Tris-HCl缓冲液,所述Tris-HCl缓冲液中含有浓度4-8wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.08-0.1wt%的叠氮钠、0.6wt%的PC-300、0.8-1wt%牛血清白蛋白和20mM/L EDTA;

[0014] (2)按照荧光素与胰岛素抗原Ⅰ摩尔比为150:1的比例,将步骤(1)中Tris-HCl缓冲液与胰岛素抗原Ⅰ混合,充分混匀,室温静置反应;

[0015] (3)将反应液通过凝胶柱分离未结合的荧光素,得到含有荧光素标记的胰岛素抗原Ⅰ溶液,调浓度和PH值,即得到含荧光素标记的胰岛素抗原Ⅰ的溶液。

[0016] 进一步的,所述含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ的溶液的制备过程如下:

[0017] (1)使用二甲基亚砜溶剂将胰岛素抗原Ⅱ溶解,保持胰岛素抗原Ⅱ的终浓度为30-60mg/mI,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2-3小时;使用二甲基亚砜溶剂将胰岛素抗原Ⅱ与辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接物1:10稀释,置2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用;

[0018] (2)按照碱性磷酸酶与(1)中连接物的摩尔比为1:2的量将碱性磷酸酶缓冲液与(1)中连接物混合均匀,室温放置反应1.5h,生成所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ;其中碱性磷酸酶缓冲液浓度为1-2mg/mI;

[0019] (3)将反应液通过G-25凝胶柱除盐,调整浓度和pH值。

[0020] 进一步的,所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液的制备过程如下:

[0021] 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应10-20h,磁分离,除上清液,调整浓度和pH,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;其中所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于0.5mmI;荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

[0022] 进一步的,所述发光底物溶液的制备过程如下:

[0023] 取TRIS 2g、NaCl 6g、Na₂SO₃ 0.005g和ProcIn-300 0.5mI于烧杯中,加入600mI纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节PH至7.5;加200mI发光底物,用0.2 μm 滤器过滤,纯化水定容至1000mI,混匀即得所述底物;其中,发光底物选自金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯中的一种或多种。

[0024] 本发明的抗胰岛素抗体检测试剂盒用于对抗胰岛素抗体定量检测方法,包括如下步骤:

[0025] (1)免疫反应:在反应管中加入待检测样本,并依次加入含荧光素标记的胰岛素抗原Ⅰ的溶液、含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ的溶液,混匀,20-40 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30min;加入包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液,混匀,20-40 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30min,获得双抗原夹心复合物,并将双抗原夹心复合物固定在磁性微球上;

[0026] (2)洗涤:加清洗液,震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除上清,清除掉没有通过待测

抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复步骤3-5次;

[0027] (3)加底物检测:在反应管中加入发光底物溶液,充分混匀,检测发光值,计算得到抗胰岛素抗体的含量。

[0028] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0029] 一、该试剂盒将免疫磁微粒技术和化学发光技术相结合,提供了一种接近均相的反应体系,让连接标记示踪物的胰岛素抗原先与待检测抗体反应,形成双抗原夹心结构的复合物。由于在形成双抗原夹心复合物的过程中,与标记抗原的都是小分子物质,其空间位阻远远小于磁性微球的空间位阻,能够促进抗原-抗体结合反应充分进行,使得灵敏度、精密度、检测范围等检测性能大大提高;

[0030] 二、采用辛二酸二琥珀酰亚胺作为交联剂进行胰岛素抗原和碱性磷酸酶偶联是,与其他交联剂相比具有更高的偶联效率,且工艺稳定,在提高检测效率的同时,降低了制备成本。

[0031] 三、试剂盒的校准品荧光素标记的胰岛素抗原I、碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II、荧光素抗体的磁微粒悬浮液发光底物等均是该反应体系下的最优配方。

[0032] 四、本发明的试剂盒能够与全自动化学发光免疫分析仪(尤其是ZECEN CIA系列全自动化学发光免疫分析仪)配套使用,实现了样本检测的全自动化,使得胰岛素抗体浓度检测可以方便、快速、简单、批量地进行,最大程度的降低了系统误差,为试剂盒的使用效期和检测性能提供保障。

附图说明

[0033] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0034] 图1为测试校准品标准曲线;

[0035] 图2为血清样本检测结果相关性。

具体实施方式

[0036] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0037] 实施例

[0038] 首先,采用以下方法制备本发明的抗胰岛素抗体检测试剂盒:

[0039] 第一步,制备含荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液

[0040] 配制含有荧光素的PH为7-9的Tris-HCl缓冲液,该述缓冲液中含有浓度4-8wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.08-0.1wt%的叠氮钠、0.6wt%的PC-300、0.8-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA。按照荧光素与胰岛素抗原I分子比为150:1的比例,将步骤(1)中PH为7-9缓冲液与胰岛素抗原I PH为7-9缓冲液混合,充分混匀,室温静置反应;将反应液通过凝胶柱分离未结合的荧光素,得到含有荧光素标记的胰岛素抗原I溶液,调浓度和PH值,即得到含荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液。

[0041] 第二步,制备含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的溶液

[0042] 使用二甲基亚砜溶剂将胰岛素抗原II溶解,保持终浓度为30-60mg/mL,

[0043] 加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2-3小时;使用二甲基亚砜溶剂将胰岛素抗原与辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接物1:10稀释,置2-8℃下保存备用;按照碱性磷酸酶与前述连接物的摩尔比为1:2的量混合均匀,室温放置反应1.5h,生成所述碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ。其中碱性磷酸酶缓冲液浓度为1-2mg/mL。将反应液通过G-25凝胶柱除盐,调整浓度和值,即得到含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ的溶液。

[0044] 第三步,制备包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液

[0045] 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应10-20h,磁分离,除上清液,调整浓度和PH,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液。其中所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于0.5mmol;荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

[0046] 第四步,发光底物的制备

[0047] 取TRIS 2g、NaCl 6g、Na₂SO₃ 0.005g和ProclIn-300 0.5mL于烧杯中,加入600mL纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节PH至7.5;加200mL发光底物,用0.2μm滤器过滤,纯化水定容至1000mL,混匀即得所述底物。

[0048] 本发明抗胰岛素抗体定量检测试剂盒的定量检测方法:

[0049] (1)检测步骤:

[0050] (1)免疫反应:在反应管中加入待检测样本,并依次加入含荧光素标记的胰岛素抗原Ⅰ的溶液、含碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原Ⅱ的溶液,混匀,20-40℃下温育30min;加入包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液,混匀,20-40℃下温育30min;

[0051] (2)洗涤:加清洗液,震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除上清,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复步骤3-5次;

[0052] (3)加底物检测:在反应管中加入发光底物溶液,充分混匀,检测发光值,计算得到抗胰岛素抗体的含量。

[0053] (4)采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以校准品发光强度值为Y轴,建立标准曲线。根据待测样本的发光强度值回算相应的浓度值。

[0054] 本发明试剂盒按照方法学鉴定,性能参数可达到如下指标:

[0055] 标准曲线线性:R大于0.999(如图1所示)

[0056] 灵敏度:对零校准品重复检测20次,计算发光强度的平均值(M)和标准差(SD),并计算M-2SD,根据标准曲线上对应的浓度,计算对应的浓度值,即为分析灵敏度。其中,灵敏度不大于0.18ng/mL。

[0057] 精密性:分析内变异、分析间变异及批间变异均小于10%(如表1所示)

[0058] a)、分析内和分析间变异数据表

[0059] 表1分析内和分析间变异数据表

		第一批 试剂	第二批 试剂	第三批试 剂
[0060]	分析内变异 (CV%)	Q 1 3.27	5.89	2.56
		Q 2 2.91	2.74	3.16
		Q 3 2.74	1.69	2.22
	分析间变异 (CV%)	Q 1 6.31	4.98	5.04
		Q 5.37	3.16	6.15
[0061]		2		
		Q 3 5.32	4.26	3.05

[0062] b)、批间变异数据表

[0063] 表2批间变异数据表

[0064]

	Q1	Q2	Q3
变异CV%	8.09	6.25	5.06

[0065] 特异性:本发明磁微粒两步特异性识别,较其他检测试剂有较好的改善。使用本发明试剂盒检测200份临床阴性血清,本试剂假阳性率为0%。

[0066] 准确性:通过添加回收方法,由参考物质发光值拟合浓度值,拟合浓度与标示浓度之比平均值在0.85-1.15之间(如表3所示)

[0067] 表3本发明试剂盒的准确性参数

准确度	参考 物质	目标浓度 ng/ml	拟合浓度 ng/ml	回 收率
(无国 标品)	10F+ 90B	6.96	6.52	93 .7%

[0069] 与同类产品对照:将本试剂盒与EIAbscience人胰岛素抗体试剂盒同时对120份临床血清样本进行测定,二者测定结果相关性较好,相关系数R为0.991(如图2所示)。

[0070] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可

以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

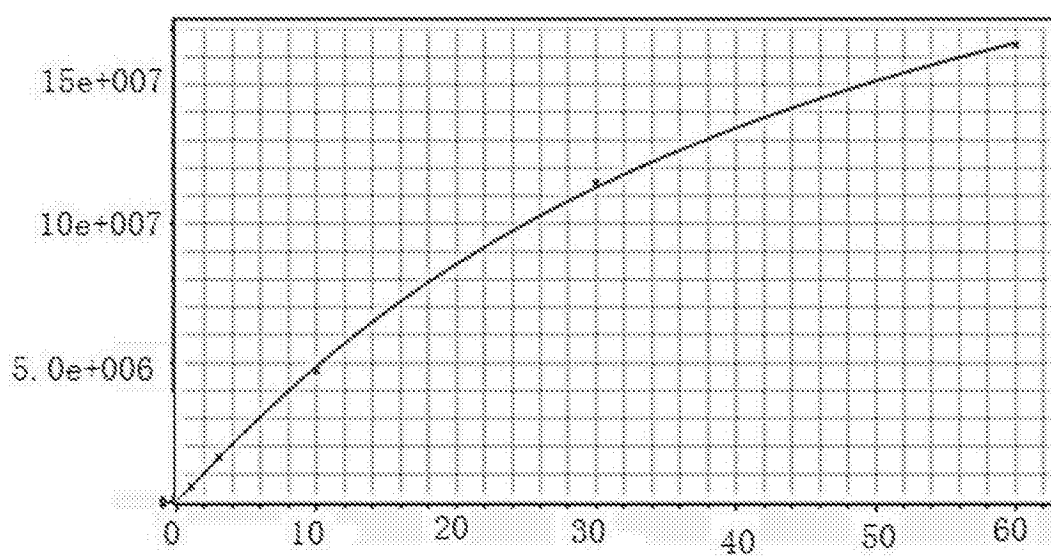


图1

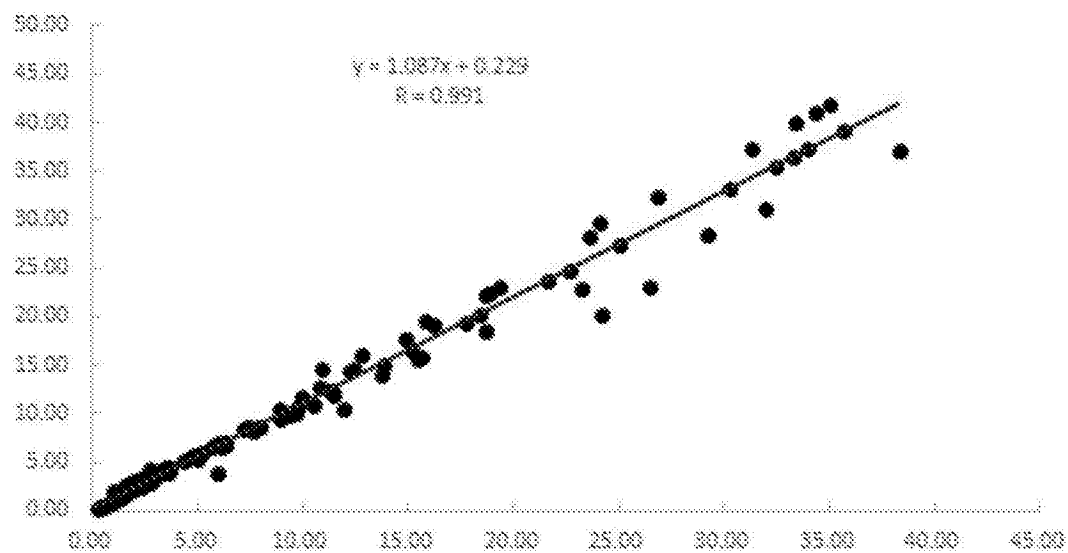


图2

专利名称(译)	一种抗胰岛素抗体检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN106324254A	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201610672237.3	申请日	2016-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	季连星 刘振国 王赞 孙裔雷 孔晓凯 丁文健 夏振伟		
发明人	季连星 刘振国 王赞 孙裔雷 孔晓凯 丁文健 夏振伟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/6854		
代理人(译)	刘刚		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗胰岛素抗体磁微粒化学发光检测试剂盒，包括荧光素标记的胰岛素抗原I的溶液、碱性磷酸酶标记的胰岛素抗原II的溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、IAA校准品和发光底物溶液。本发明将磁微粒技术和化学发光技术相结合，提供了一种趋于均相的反应体系。本发明将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，并且采用了一步法反应模式，使得检测灵敏度、精密性大大提高、检测范围扩大，能够以更高准确度、特异性、精密度和更低成本对抗胰岛素抗体进行定量检测。

