



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103869059 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201410120353.5

(22) 申请日 2014.03.27

(71) 申请人 上海奥普生物医药有限公司

地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路 526 号

(72) 发明人 杨晶 翟小杰 沈旭辉

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有

限公司 31227

代理人 吴瑾瑜

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/76 (2006.01)

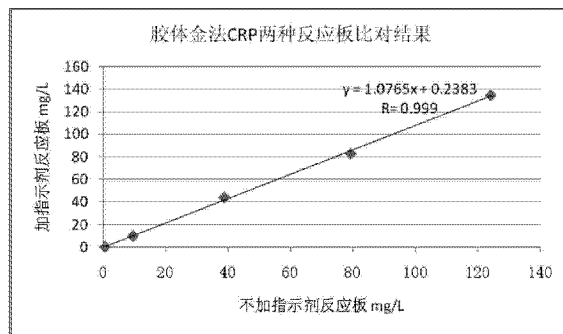
权利要求书1页 说明书19页 附图3页

(54) 发明名称

一种诊断试剂盒的点样方法

(57) 摘要

本发明属于诊断试剂领域,具体为将显色指示剂用于制备诊断试剂。将含有生物原料的点样缓冲液喷涂或者包被在基质上,点样缓冲液中还含有显色指示剂。运用该点样方法,可明显区分在生产操作中的中间品是否进行点样操作,有利于在点样过程中即去除不符合产品标准的中间品,也有利于点样过程中对异常情况的及时发现处理,提高生产效率,降低生产过程中错误率。



1. 一种诊断试剂盒的点样方法,包括将含有生物原料的点样缓冲液喷涂或者包被在基质上,其特征在于,点样缓冲液中还含有显色指示剂,所述的显色指示剂选自甲基橙、溴酚蓝、百里酚蓝、茜素红 S、溴甲酚绿、甲基红、溴酚红、溴甲酚紫、溴百里酚蓝、酚红、甲酚红、百里酚酞。

2. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,所述的显色指示剂选自甲基橙、溴酚蓝、百里酚蓝、甲基红、溴酚红、溴甲酚紫或溴百里酚蓝。

3. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,所述的生物原料为抗原、重组抗体、单克隆抗体或多克隆抗体。

4. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,所述的生物原料为 C 反应蛋白抗体、D-二聚体蛋白抗体、尿微量白蛋白抗体、人绒毛膜促性腺激素抗体、血清淀粉样蛋白 A 抗体、肌钙蛋白抗体、脑钠肽前体抗体、肌红蛋白抗体或结核分支杆菌抗原。

5. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,所述的诊断试剂盒为免疫反应试剂盒。

6. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,所述的诊断试剂盒为胶体金免疫反应试剂盒或荧光免疫反应试剂盒。

7. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,点样缓冲液中,显色指示剂的含量为 0.0005wt% ~ 0.1wt%。

8. 权利要求 1 所述诊断试剂盒的点样方法,其特征在于,点样缓冲液中显色指示剂的含量为 0.001wt% ~ 0.05wt%。

9. 显色剂用于制备免疫反应诊断试剂盒、反应板或试纸条,其特征在于,所述的显色指示剂选自甲基橙、溴酚蓝、百里酚蓝、茜素红 S、溴甲酚绿、甲基红、溴酚红、溴甲酚紫、溴百里酚蓝、酚红、甲酚红或百里酚酞。

一种诊断试剂盒的点样方法

技术领域

[0001] 本发明属于诊断试剂领域,具体为将显色指示剂用于制备诊断试剂。

背景技术

[0002] 体外诊断试剂主要用于疾病的诊断、预防、疗效和预后的判断、治疗药物的监测、健康状况的评价和遗传性疾病的预测。

[0003] 体外诊断试剂所应用的方法学主要有酶标法、胶体金法、免疫荧光法、体外核酸扩增(PCR)、生物芯片等,其中胶体金法、免疫荧光法、生物芯片等诸多方法学中均包含点样这一关键步骤,即将生物原料包括各种天然抗原、重组抗原、单克隆抗体、多克隆抗体及多肽类生物原料等,固定在特制的基质上(例如硝酸纤维素膜、尼龙膜等),之后通过加样等一系列反应,实现对样品的定性或定量的检测。

[0004] 在诊断试剂生产过程中,影响工艺过程的因素有很多,其中点样的质量控制对成品质量的稳定性有着很大影响。一般来说,大部分生物原料为澄清透明的液体,不含异物、浑浊或沉淀颗粒等,亦不含有其他颜色的杂质,肉眼观察外观,应符合原辅料的质量控制标准。

[0005] 整个点样过程主要包括点样和烘干两个主要步骤。生物原料经点样缓冲液稀释后,经机械点样或人工点样,固定在特殊基质上。

[0006] 从多年的诊断试剂生产经验得知,点样的斑点大小形状、线条的粗细均匀度等均影响最终样品的检测结果。同样的产品,若点样的斑点位置、大小形状、线条粗细等差异大,则产品批间、批内 CV 值会升高,影响检测精度;如果生物原料的点样位置位于基质中间、点样的形状较规则时,检测精度较好。

[0007] 而澄清透明的液体点样烘干后,肉眼无法观察点样的最终形状,一些形状存在明显差异的点样斑点、线条也无法区分,从而导致产品批间、批内 CV 升高。

[0008] 因此,需要对现有技术加以改进以克服上述问题。

发明内容

[0009] 本发明旨在提供一种点样缓冲液,含有显色指示剂,可用于免疫体外诊断试剂盒包被抗原抗体。

[0010] 本发明技术方案为,将显色指示剂用于制备免疫反应检测试剂盒的点样缓冲液,制备免疫反应检测的反应板或试纸条。

[0011] 本发明是在点样缓冲液中加入一种不与该生物原料反应、且不影响整个测试反应的显色指示剂,在点样烘干后可清晰辨别点样的形状、大小、均匀度,从而进行质控,剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试纸条。

[0012] 显色指示剂优选为甲基橙、溴酚蓝、百里酚蓝(麝香草酚蓝)、茜素红 S、溴甲酚绿、甲基红、溴酚红、溴甲酚紫、溴百里酚蓝、酚红、甲酚红、百里酚酞。

[0013] 将这些显色指示剂与含有与生物原料(如天然抗原、重组抗原、单克隆抗体、多克

隆抗体及多肽类等)的点样缓冲液混合,喷涂到基质上。

[0014] 显色指示剂在点样缓冲液中的含量为 0.0005wt% ~ 0.1wt%, 优选为 0.001wt% ~ 0.05wt%。

[0015] 所述的生物原料为抗原或抗体, 优选的, 为抗原、重组抗体、单克隆抗体或多克隆抗体。更优选的, 所述的抗体为 C- 反应蛋白(CRP)抗体、D- 二聚体蛋白抗体、尿微量白蛋白抗体、人绒毛膜促性腺激素抗体、血清淀粉样蛋白 A 抗体、肌钙蛋白抗体、脑钠肽前体抗体、肌红蛋白抗体, 抗原为结核分支杆菌抗原。

[0016] 试剂盒、反应板或试纸条应用的检测方法可以是胶体金免疫反应(胶体金免疫渗滤反应或胶体金免疫层析反应)、免疫荧光反应(如荧光免疫层析反应)等方法。

[0017] 本发明在点样缓冲液中加入了不与该生物原料反应、且不影响整个测试反应的显色指示剂, 并通过浓度, 获得最佳的显色浓度, 点样烘干后可清晰辨别点样的形状、大小、均匀度等。该方法可应用到一切包含点样操作的诊断试剂生产中, 不受方法学的限制。使用时, 加入封闭液之后冲掉显色指示剂, 反应板和试纸条的点样位置恢复为无色, 再加入待测样品进行反应。

[0018] 运用该点样方法, 可明显区分在生产操作中的中间品是否进行点样操作, 有利于在点样过程中即去除不符合产品标准的中间品, 也有利于点样过程中对异常情况的及时发现处理, 提高生产效率, 降低生产过程中错误率。若将该方法应用到胶体金法、免疫荧光法中, 在产品使用过程中可明显区分已使用与未使用的反应板、试纸条, 减少实验误差。

附图说明

[0019] 图 1 为实施例 1 加入显色指示剂或者不加显色指示剂的胶体金法 CRP 反应板的检测比较

[0020] 图 2 为实施例 1 加入显色指示剂或者不加显色指示剂的荧光免疫法 CRP 试纸条的检测比较

[0021] 图 3 为实施例 3 加入显色指示剂或者不加显色指示剂的胶体金法 D- 二聚体反应板的检测比较

[0022] 图 4 为实施例 4 加入显色指示剂或者不加显色指示剂的胶体金法尿微量白蛋白反应板的检测比较

[0023] 图 5 为实施例 5 加入显色指示剂或者不加显色指示剂的胶体金法人绒毛膜促性腺激素反应板的检测比较

[0024] 图 6 为实施例 6 加入显色指示剂或者不加显色指示剂的胶体金法血清淀粉样蛋白 A 反应板的检测比较

具体实施方式

[0025] 实施例 1 胶体金法点样(超敏 C- 反应蛋白)

[0026] (一) 超敏 C- 反应蛋白(hs-CRP)快速定量试剂盒(胶体金法)的制备

[0027] 该试剂盒主要由反应板、冻干的抗 CRP 免疫胶体金缀合物及各种缓冲液组成。该试剂盒采用的原理为渗滤法。制备反应板的关键工艺为在硝酸纤维素膜上点样稀释的 CRP 抗体。点样缓冲液(pH=3 ~ 6)中加入溴酚蓝(0.002wt%), 其余工艺不变, 对比加入指示剂

的反应板与不加指示剂的反应板,考察试剂盒性能。

[0028] 先将溴酚蓝溶解于 20wt% ~ 98wt% 酒精溶液中,配制成 1g/L 的溶液,再用点样缓冲液逐级稀释,直至点样缓冲液中含 0.002wt% 溴酚蓝。

[0029] 加入了显色指示剂的反应板,点样干燥后显示为黄色或蓝色,清晰显示 CRP 抗体点样的形状、位置、大小和均匀度。也可以明显区分点样和未点样的反应板。

[0030] 使用时,先向反应板上加入封闭液,即可冲洗去除溴酚蓝显色指示剂,然后加入待测样品显色反应。这样可以明显地区分已使用及未使用的反应板,减少实验误差,避免误操作。

[0031] (二) 比对两种反应板(加入指示剂和不加指示剂)的重复性及线性范围等性能

[0032] 1. 用两种反应板分别测试 10mg/L CRP 标准品(cutoff 值),结果如表 1。

[0033] 表 1

序号	加入指示剂	不加指示剂
1	8.54	11.41
2	11.61	9.86
3	9.54	10.49
4	10.12	9.34
5	10.81	11.82
[0034] 6	11.43	10.52
7	8.15	8.09
8	8.69	9.13
9	10.22	11.55
10	9.21	11.28
平均值	9.832	10.349
变异系数(CV)	12.31%	11.83%

[0035] 用 CRP 的 cutoff 值 10mg/L 的标准品作为样本,按上述两种反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示其加指示剂和不加指示剂 CV 分别为 12.31% 和 11.83%;以 $(1 - \text{平均值} / \text{标示值}) * 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,分别为 1.68% 和 -3.49%。P>0.05,没有显著性差异。

[0036] 2. 考察两种反应板稳定性

[0037] 将加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板分别放置在 2-8℃ 和 37℃,用 CRP 标准品 10mg/L 测试,各重复测定 3 次,测试均值与起始均值相差 ≤ 20% 为稳定性合格,考察稳定性。结果如表 2,加入显色剂后稳定性不受影响。

[0038] 表 2

	试纸条种类	测试平均值			
		2-8℃3天	37℃3天	2-8℃7天	37℃7天
[0039]	不加指示剂	9.46	9.88	9.89	9.46
	加指示剂	9.13	9.48	9.71	10.08
	结论	稳定		稳定	

[0040] 3. 考察两种反应板线性范围

[0041] 将两种反应板测试不同浓度的 CRP 标准品, 每种标准品各测试 3 次取平均值。将两种反应板进行比对, 比对方程为 $Y=1.0765X+0.2383$, 相关系数 $R=0.999$, 说明这两种反应板无显著性差异。结果如图 1 和表 3。

[0042] 表 3

	测试浓度	加入指示剂	不加指示剂
	0.5mg/L	0.49	0.59
	10mg/L	10.12	9.49
[0043]	40mg/L	44.29	38.79
	80mg/L	83.12	79.28
	120mg/L	134.76	124.15

[0044] 用百里酚蓝(麝香草酚蓝)、溴百里酚蓝、溴甲酚绿、甲基橙、甲基红或者甲基橙代替溴酚蓝, 效果与溴酚蓝相似, 在点样缓冲液中的含量最低可达 0.0005wt%。

[0045] 使用酚酞、刚果红代替溴酚蓝时, 显色不明显或者封闭液冲洗的效果不好。

[0046] (三) 用显色指示剂质控的反应板可改进精度和偏差

[0047] 按照(一)的方法点样制备超敏 C-反应蛋白 (hs-CRP) 快速定量试剂盒, 并根据点样的形状、大小、均匀度, 从而进行质控, 剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试样条。

[0048] 对照 1 为正常生产未经过挑选的反应板, 对照 2 是点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板, 测试组为经过挑选的未偏移、没有不规则或不均匀形状的反应板, 每组各 10 个, 比较三者的检测结果, 结果如表 4。

[0049] 表 4

序号	对照 1	对照 2	质控
1	8.94	9.19	10.43
2	9.43	10.58	8.19
3	8.25	11.32	8.40
4	11.59	7.29	9.91
5	8.34	8.56	10.32
[0050] 6	11.22	9.12	10.01
7	10.11	12.12	10.64
8	8.17	11.21	9.64
9	8.92	8.21	9.66
10	9.38	9.11	10.31
平均值	9.435	9.671	10.2
变异系数 (CV)	12.74%	16.09%	8.18%

[0051] 用 CRP 的 cutoff 值 10mg/L 的标准品作为样本,按上述三种质控和对照反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示质控筛选后的反应板、对照未经筛选的反应板和全是不均匀或不规则的反应板测试 CV 分别为 8.18%、12.74% 和 16.09%,CV 明显改善。由此可见,通过上述方法,可对点样的结果进行质控,减少检测偏差,提高精度。

[0052] 实施例 2 免疫荧光法点样(C-反应蛋白)

[0053] (一) C-反应蛋白 (CRP) 定量测试试剂盒(免疫荧光法)的制备

[0054] 试剂盒由层析试纸条、上样缓冲液组成。层析试纸条主要包括样品垫、包被膜、吸水纸等组成。该试纸条的关键工艺是将含有 CRP 抗体的点样液 (pH=3 ~ 6) 喷到包被膜(包被膜为尼龙膜或硝酸纤维素膜)上。

[0055] 溴百里酚蓝、甲基橙或甲基红用 20wt% ~ 98wt% 酒精溶液溶解,配制成 1g/L 的溶液,再用点样液逐级稀释,直至点样液中含量为 0.001wt% (最低可达 0.0005wt%)。再将含有 CRP 抗体和显色指示剂的点样液喷到包被膜上,得到试纸条。

[0056] 再用不含显色指示剂的点样液喷涂包被膜,其他工艺不变,得到对照试纸条。

[0057] 加入了显色指示剂的试纸条,点样干燥后显色,清晰显示 CRP 抗体点样的形状、位置、大小和均匀度。也可以明显区分点样和未点样的反应板。

[0058] 使用时,先向反应板上加入封闭液,即可冲洗去除溴酚蓝显色指示剂,然后加入待测样品显色反应。这样可以明显地区分已使用及未使用的反应板,减少实验误差,避免误操作。

[0059] (二) 对比两种试纸条(加入指示剂和不加指示剂)的重复性及线性范围等性能。

[0060] 1. 用步骤(一)的两种试纸条(显色指示剂甲基橙或者不加显色指示剂)分别测试

10mg/LCRP 标准品 (cutoff 值), 结果如表 5。

[0061] 表 5

序号	加入指示剂	不加指示剂
1	8.2	11.87
2	10.72	10.07
3	10.2	8.57
4	11.95	10.45
5	8.03	8.24
6	10.88	9.67
7	9.92	10.73
8	10.49	8.35
9	9.09	9.96
10	10.16	10.09
平均值	9.964	9.8
变异系数 (CV)	12.22%	11.69%

[0064] 用 CRP 的 cutoff 值 10mg/L 的标准品作为样本, 按上述两种试纸条按照试剂盒检测样品所述方法测定, 各测定 10 次, 分别计算平均值和变异系数 CV。其中, 计算 CV 进行重复性考察, 结果显示其加指示剂和不加指示剂 CV 分别为 12.22% 和 11.69%; 以 $(1 - \text{平均值} / \text{标示值}) * 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察, 分别为 0.36% 和 2.00%, $P > 0.05$, 没有显著性差异。

[0065] 2. 考察两种试纸条稳定性

[0066] 将加入指示剂的试纸条与不加指示剂的试纸条分别放置在 2-8°C 和 37°C, 用 CRP 标准品 10mg/L 测试, 各重复测定 3 次, 测试均值与起始均值相差 $\leq 15\%$ 为稳定性合格, 考察稳定性。结果如表 6, 加入显色剂后稳定性不受影响。

[0067] 表 6

试纸条种类	测试平均值			
	2-8°C 3 天	37°C 3 天	2-8°C 7 天	37°C 7 天
不加指示剂	9.53	10.26	9.42	9.93
加指示剂	9.78	10.43	9.31	10.29
结论	稳定		稳定	

[0069] 3. 考察两种试纸条线性范围

[0070] 将两种试纸条测试不同浓度的 CRP 标准品,每种标准品各测试 3 次取平均值。将两种试纸条进行比对,比对方程为 $Y=1.0025X+0.9069$,相关系数 $R=0.999$,说明这两种试纸条无显著性差异。结果如图 2 和表 7。

[0071] 表 7

	测试浓度	加入指示剂	不加指示剂
	0.5mg/L	0.44	0.38
[0072]	10mg/L	10.36	10.24
	40mg/L	43.59	38.64
	80mg/L	75.44	77.28
[0073]	120mg/L	128.76	126.87

[0074] 使用同样浓度的酚酞、刚果红、中性红代替溴酚蓝时,显色不明显或者封闭液冲洗的效果不好。

[0075] 以上比较说明,加入的显色指示剂与抗体、试剂及待测样品都不发生反应,对免疫反应不发生不影响。

[0076] (三)用显色指示剂质控的反应板可改进精度和偏差

[0077] 按照(一)的方法点样制备免疫荧光法 C- 反应蛋白定量试剂盒,并根据点样的形状、大小、均匀度,从而进行质控,剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的试样条。

[0078] 对照 1 为正常生产未经过挑选的反应板,对照 2 是点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板,测试组为经过挑选的未偏移、没有不规则或不均匀形状的反应板,每组各 10 个,比较三者的检测结果,结果如表 8。

[0079] 表 8

序号	对照 1	对照 2	质控
1	9.54	7.32	9.13
2	9.87	10.64	9.66
3	10.26	9.09	9.98
4	11.43	11.34	10.23
5	9.62	9.74	11.56
[0080] 6	8.3	8.25	10.81
7	11.64	8.61	11.43
8	9.21	9.76	8.92
9	9.64	7.52	10.52
10	11.69	10.65	10.01
平均值	10.12	9.292	10.20
变异系数 (CV)	11.18%	14.75%	8.64%

[0081] 用 CRP 的 cutoff 值 10mg/L 的标准品作为样本,按上述三种质控和对照反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示质控筛选后的反应板、对照未经筛选的反应板和全是不均匀或不规则的反应板测试 CV 分别为 8.64%、11.18% 和 14.75%, CV 明显改善。由此可见,通过上述方法,可对点样的结果进行质控,减少检测偏差,提高精度。

[0082] 实施例 3 胶体金法点样(D-二聚体)

[0083] (一) D-二聚体检测试剂盒(胶体金法)的制备

[0084] 该试剂盒主要由反应板、冻干的抗 D-二聚体免疫胶体金缀合物及各种缓冲液组成。该试剂盒采用的原理为渗滤法。制备反应板的关键工艺为在硝酸纤维素膜上点样稀释的 D-二聚体抗体。点样缓冲液(pH=3~6)中加入溴酚蓝(0.002wt%),其余工艺不变,对比加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板,考察试剂盒性能。

[0085] 先将溴酚蓝溶解于 20wt%~98wt% 酒精溶液中,配制成 1g/L 的溶液,再用点样缓冲液逐级稀释,直至点样缓冲液中含 0.002wt% 溴酚蓝。

[0086] 加入了显色指示剂的反应板,点样干燥后显示为黄色或蓝色,清晰显示 D-二聚体抗体点样的形状、位置、大小和均匀度。也可以明显区分点样和未点样的反应板。

[0087] 使用时,先向反应板上加入封闭液,即可冲洗去除溴酚蓝显色指示剂,然后加入待测样品显色反应。这样可以明显地区分已使用及未使用的反应板,减少实验误差,避免误操作。

[0088] (二) 比对两种反应板(加入指示剂和不加指示剂)的重复性及线性范围等性能

[0089] 1. 用两种反应板分别测试 0.3mg/L D-二聚体标准品(cutoff 值),结果如表 9。

[0090] 表 9

	序号	加入指示剂	不加指示剂
	1	0.31	0.33
	2	0.32	0.31
	3	0.33	0.29
	4	0.29	0.23
	5	0.3	0.29
[0091]	6	0.27	0.3
	7	0.24	0.3
	8	0.34	0.31
	9	0.26	0.23
	10	0.35	0.34
	平均值	0.301	0.293
	变异系数 (CV)	11.97%	12.57%

[0092] 用 D-二聚体的 cutoff 值 0.3mg/L 的标准品作为样本,按上述两种反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示其加指示剂和不加指示剂 CV 分别为 11.97% 和 12.57%;以 $(1 - \text{平均值} / \text{标示值}) * 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,分别为 -0.33% 和 2.33%。 $P > 0.05$,没有显著性差异。

[0093] 2. 考察两种反应板稳定性

[0094] 将加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板分别放置在 2-8°C 和 37°C,用 D-二聚体标准品 0.3mg/L 测试,各重复测定 3 次,测试均值与起始均值相差 $\leq 20\%$ 为稳定性合格,考察稳定性,结果如表 10,加入显色剂后稳定性不受影响。

[0095] 表 10

	反应板种类	测试平均值			
		2-8°C 3 天	37°C 3 天	2-8°C 7 天	37°C 7 天
[0096]	不加指示剂	0.31	0.30	0.28	0.33
	加指示剂	0.29	0.32	0.29	0.29
	结论	稳定		稳定	

[0097] 3. 考察两种反应板线性范围

[0098] 将两种反应板测试不同浓度的 D-二聚体标准品,每种标准品各测试 3 次取平均值。将两种反应板进行比对,比对方程为 $y = 1.008x + 0.031$,相关系数 $R = 0.999$,说明这两种反应板无显著性差异。结果如图 3 和表 11。

[0099] 表 11

	测试浓度	加入指示剂	不加指示剂
	0.1mg/L	0.09	0.11
	0.3mg/L	0.31	0.3
[0100]	0.5mg/L	0.46	0.49
	1mg/L	0.94	0.99
	2mg/L	1.89	2.03
	4mg/L	3.92	3.94

[0101] 用百里酚蓝(麝香草酚蓝)、溴百里酚蓝、溴甲酚绿、甲基橙、甲基红或者甲基橙代替溴酚蓝,效果与溴酚蓝相似,在点样缓冲液中的含量最低可达 0.0005wt%。

[0102] 使用酚酞、刚果红代替溴酚蓝时,显色不明显或者封闭液冲洗的效果不好。

[0103] (三)用显色指示剂质控的反应板可改进精度和偏差

[0104] 按照(一)的方法点样制备 D-二聚体检测试剂盒,并根据点样的形状、大小、均匀度,从而进行质控,剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试样条。

[0105] 对照 1 为正常生产未经过挑选的反应板,对照 2 是点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板,测试组为经过挑选的未偏移、没有不规则或不均匀形状的反应板,每组各 10 个,比较三者的检测结果,结果如表 12。

[0106] 表 12

[0107]	序号	对照 1	对照 2	质控
--------	----	------	------	----

	1	0.28	0.25	0.26
	2	0.24	0.27	0.27
	3	0.27	0.35	0.27
	4	0.33	0.38	0.31
	5	0.33	0.24	0.31
	6	0.35	0.29	0.25
[0108]	7	0.3	0.31	0.29
	8	0.28	0.33	0.29
	9	0.3	0.28	0.3
	10	0.34	0.24	0.28
	平均值	0.3	0.294	0.283
	变异系数 (CV)	11.66%	16.29%	7.27%

[0109] 用 D-二聚体的 cutoff 值 0.3mg/L 的标准品作为样本,按上述三种质控和对照反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示质控筛选后的反应板、对照未经筛选的反应板和全是不均匀或不规则的反应板测试 CV 分别为 7.27%、11.66% 和 16.29%,CV 明显改善。由此可见,通过上述方法,可对点样的结果进行质控,减少检测偏差,提高精度。

[0110] 实施例 4 胶体金法点样(尿微量白蛋白)

[0111] (一) 尿微量白蛋白快速定量试剂盒(胶体金法)的制备

[0112] 该试剂盒主要由反应板、冻干的抗尿微量白蛋白免疫胶体金缀合物及各种缓冲液组成。该试剂盒采用的原理为渗滤法。制备反应板的关键工艺为在硝酸纤维素膜上点样稀释的尿微量白蛋白抗体。点样缓冲液(pH=3~6)中加入溴酚蓝(0.002wt%),其余工艺不变,对比加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板,考察试剂盒性能。

[0113] 先将溴酚蓝溶解于 20wt%~98wt% 酒精溶液中,配制成 1g/L 的溶液,再用点样缓冲液逐级稀释,直至点样缓冲液中含 0.002wt% 溴酚蓝。

[0114] 加入了显色指示剂的反应板,点样干燥后显示为黄色或蓝色,清晰显示尿微量白蛋白抗体点样的形状、位置、大小和均匀度。也可以明显区分点样和未点样的反应板。

[0115] 使用时,先向反应板上加入封闭液,即可冲洗去除溴酚蓝显色指示剂,然后加入待测样品显色反应。这样可以明显地区分已使用及未使用的反应板,减少实验误差,避免误操作。

[0116] (二) 比对两种反应板(加入指示剂和不加指示剂)的重复性及线性范围等性能

[0117] 1. 用两种反应板分别测试 30mg/L 尿微量白蛋白标准品(cutoff 值),结果如表 13。

[0118] 表 13

序号	加入指示剂	不加指示剂
1	24.57	31.42
2	28.75	33.68
3	32.45	35.83
4	29.16	29
5	25.49	25.32
[0119] 6	28.72	31.31
7	33.81	35.43
8	34.44	34.38
9	32.87	28.77
10	34.73	26.29
平均值	30.499	31.143
变异系数 (CV)	12.08%	11.96%

[0120] 用尿微量白蛋白的 cutoff 值 30mg/L 的标准品作为样本,按上述两种反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示其加指示剂和不加指示剂 CV 分别为 12.08% 和 11.96%;以 $(1 - \text{平均值} / \text{标示值}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,分别为 -1.66% 和 -3.81%。P>0.05,没有显著性差异

[0121] 2. 考察两种反应板稳定性

[0122] 将加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板分别放置在 2-8℃ 和 37℃,用尿微量白蛋白标准品 30mg/L 测试,各重复测定 3 次,测试均值与起始均值相差 $\leq 20\%$ 为稳定性合格,考察稳定性,结果如表 14,加入显色剂后稳定性不受影响。

[0123] 表 14

反应板种类	测试平均值			
	2-8℃3 天	37℃3 天	2-8℃7 天	37℃7 天
[0124] 不加指示剂	32.41	28.73	27.29	33.68
加指示剂	30.52	31.44	29.58	29.97
结论	稳定		稳定	

[0125] 3. 考察两种反应板线性范围

[0126] 将两种反应板测试不同浓度的尿微量白蛋白标准品,每种标准品各测试 3 次取平均值。将两种反应板进行比对,比对方程为 $y=0.978x+2.403$,相关系数 $R=0.999$,说明这两种反应板无显著性差异。结果如图 4 和表 15。

[0127] 表 15

	测试浓度	加入指示剂	不加指示剂
	5mg/L	4.87	5.23
	20 mg/L	22.19	19.79
[0128]	30 mg/L	28.52	31.62
	80 mg/L	79.61	84.15
	100 mg/L	105.81	110.38
	200 mg/L	211.18	205.65

[0129] 用百里酚蓝(麝香草酚蓝)、溴百里酚蓝、溴甲酚绿、甲基橙、甲基红或者甲基橙代替溴酚蓝,效果与溴酚蓝相似,在点样缓冲液中的含量最低可达 0.0005wt%。

[0130] 使用酚酞、刚果红代替溴酚蓝时,显色不明显或者封闭液冲洗的效果不好。

[0131] (三)用显色指示剂质控的反应板可改进精度和偏差

[0132] 按照(一)的方法点样制备尿微量白蛋白检测试剂盒,并根据点样的形状、大小、均匀度,从而进行质控,剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试样条。

[0133] 对照 1 为正常生产未经过挑选的反应板,对照 2 是点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板,测试组为经过挑选的未偏移、没有不规则或不均匀形状的反应板,每组各 10 个,比较三者的检测结果,结果如表 16。

[0134] 表 16

	序号	对照 1	对照 2	质控
	1	27.81	26.43	28.64
	2	30.26	31.52	29.52
	3	34.07	33.45	35.67
	4	32.83	29.74	27.62
	5	34.93	24.21	28.13
[0135]	6	25.73	28.65	29.48
	7	28.95	35.49	29.19
	8	24.36	23.26	32.65
	9	31.79	34.53	30.64
	10	30.93	36.28	31.23
	平均值	30.17	30.356	30.28
	变异系数 (CV)	11.52%	15.40%	7.98%

[0136] 用尿微量白蛋白的 cutoff 值 30mg/L 的标准品作为样本,按上述三种质控和对照反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示质控筛选后的反应板、对照未经筛选的反应板和全是不均匀或不规则的反应板测试 CV 分别为 7.98%、11.52% 和 15.40%,CV 明显改善。由此可见,通过上述方法,可对点样的结果进行质控,减少检测偏差,提高精度。

[0137] 实施例 5 胶体金法点样(人绒毛膜促性腺激素)

[0138] (一) 人绒毛膜促性腺激素快速定量试剂盒(胶体金法)的制备

[0139] 该试剂盒主要由反应板、冻干的抗人绒毛膜促性腺激素免疫胶体金缀合物及各种缓冲液组成。该试剂盒采用的原理为渗滤法。制备反应板的关键工艺为在硝酸纤维素膜上点样稀释的人绒毛膜促性腺激素抗体。点样缓冲液(pH=3~6)中加入溴酚蓝(0.002wt%),其余工艺不变,对比加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板,考察试剂盒性能。

[0140] 先将溴酚蓝溶解于 20wt%~98wt% 酒精溶液中,配制成 1g/L 的溶液,再用点样缓冲液逐级稀释,直至点样缓冲液中含 0.002wt% 溴酚蓝。

[0141] 加入了显色指示剂的反应板,点样干燥后显示为黄色或蓝色,清晰显示尿微量白蛋白抗体点样的形状、位置、大小和均匀度。也可以明显区分点样和未点样的反应板。

[0142] 使用时,先向反应板上加入封闭液,即可冲洗去除溴酚蓝显色指示剂,然后加入待测样品显色反应。这样可以明显地区分已使用及未使用的反应板,减少实验误差,避免误操作。

[0143] (二) 比对两种反应板(加入指示剂和不加指示剂)的重复性及线性范围等性能

[0144] 1. 用两种反应板分别测试 25mIU 人绒毛膜促性腺激素标准品(cutoff 值),结果如表 17。

[0145] 表 17

序号	加入指示剂	不加指示剂
1	27.32	22.61
2	28.75	25.49
3	23.25	28.88
4	22.68	24.61
5	27.01	27.39
6	29.54	20.65
7	24.91	27.43
8	23.28	25.87
9	27.98	29.33
10	20.34	20.68
平均值	25.51	25.29
变异系数(CV)	11.95%	12.43%

[0148] 用人绒毛膜促性腺激素的 cutoff 值 25mg/L 的标准品作为样本,按上述两种反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示其加指示剂和不加指示剂 CV 分别为 11.95% 和 12.43%;以 $(1 - \text{平均值} / \text{标示值}) * 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,分别为 -2.02% 和 -1.18%。 $P > 0.05$,没有显著性差异。

[0149] 2. 考察两种反应板稳定性

[0150] 将加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板分别放置在 2-8℃ 和 37℃,用人绒毛膜促性腺激素标准品 25mg/L 测试,各重复测定 3 次,测试均值与起始均值相差 $\leq 20\%$ 为稳定性合格,考察稳定性。结果如表 18,

[0151] 表 18

反应板种类	测试平均值			
	2-8℃3 天	37℃3 天	2-8℃7 天	37℃7 天
[0152] 不加指示剂	26.13	27.32	26.88	24.79
加指示剂	25.49	25.19	26.17	25.53
结论	稳定		稳定	

[0153] 3. 考察两种反应板线性范围

[0154] 将两种反应板测试不同浓度的人绒毛膜促性腺激素标准品,每种标准品各测试 3 次取平均值。将两种反应板进行比对,比对方程为 $y = 1.031x + 11.71$,相关系数 $R = 0.999$,说明这两种反应板无显著性差异。结果如图 5 和表 19。

[0155] 表 19

测试浓度	加入指示剂	不加指示剂
[0156] 10mIU	10	9
25mIU	26	25
100 mIU	95	101
[0157] 500 mIU	480	493
1000 mIU	980	1019
2500 mIU	2405	2594
5000 mIU	4800	4916

[0158] 用百里酚蓝(麝香草酚蓝)、溴百里酚蓝、溴甲酚绿、甲基橙、甲基红或者甲基橙代替溴酚蓝,效果与溴酚蓝相似,在点样缓冲液中的含量最低可达 0.0005wt%。

[0159] 使用酚酞、刚果红代替溴酚蓝时,显色不明显或者封闭液冲洗的效果不好。

[0160] (三)用显色指示剂质控的反应板可改进精度和偏差

[0161] 按照(一)的方法点样制备人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒,并根据点样的形状、大小、均匀度,从而进行质控,剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试样条。

[0162] 对照 1 为正常生产未经过挑选的反应板,对照 2 是点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板,测试组为经过挑选的未偏移、没有不规则或不均匀形状的反应板,每组各 10 个,比较三者的检测结果,结果如表 20。

[0163] 表 20

序号	对照 1	对照 2	质控
1	20.02	22.63	25.83
2	24.13	30.18	27
3	26.94	24.31	28.43
4	25.72	26.94	27.62
5	24.35	31.05	28.13
6	20.71	22.84	24.61
7	24.19	28.75	22.78
8	25.98	31.38	25.37
9	24.35	20.07	23.64
10	29.97	25.2	23.19
平均值	24.64	26.335	25.66
变异系数 (CV)	11.65%	14.94%	8.12%

[0166] 用人绒毛膜促性腺激素的 cutoff 值 25mg/L 的标准品作为样本,按上述三种质控和对照反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示质控筛选后的反应板、对照未经筛选的反应板和全是不均匀或不规则的反应板测试 CV 分别为 8.12%、11.65% 和 14.94%, CV 明显改善。由此可见,通过上述方法,可对点样的结果进行质控,减少检测偏差,提高精度。

[0167] 实施例 6 胶体金法点样(血清淀粉样蛋白 A)

[0168] (一) 血清淀粉样蛋白 A (SAA) 定量试剂盒(胶体金法)的制备

[0169] 该试剂盒主要由反应板、冻干的抗血清淀粉样蛋白 A 免疫胶体金缀合物及各种缓冲液组成。该试剂盒采用的原理为渗滤法。制备反应板的关键工艺为在硝酸纤维素膜上点样稀释的血清淀粉样蛋白 A 抗体。点样缓冲液(pH=3~6)中加入溴酚蓝(0.002wt%),其余工艺不变,对比加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板,考察试剂盒性能。

[0170] 先将溴酚蓝溶解于 20wt%~98wt% 酒精溶液中,配制成 1g/L 的溶液,再用点样缓冲液逐级稀释,直至点样缓冲液中含 0.002wt% 溴酚蓝。

[0171] 加入了显色指示剂的反应板,点样干燥后显示为黄色或蓝色,清晰显示尿微量白

蛋白抗体点样的形状、位置、大小和均匀度。也可以明显区分点样和未点样的反应板。

[0172] 使用时,先向反应板上加入封闭液,即可冲洗去除溴酚蓝显色指示剂,然后加入待测样品显色反应。这样可以明显地区分已使用及未使用的反应板,减少实验误差,避免误操作。

[0173] (二) 比对两种反应板(加入指示剂和不加指示剂)的重复性及线性范围等性能

[0174] 1. 用两种反应板分别测试 10mg/L 血清淀粉样蛋白 A 标准品(cutoff 值),结果如表 21。

[0175] 表 21

序号	加入指示剂	不加指示剂
1	10.32	8.14
2	11.52	9.52
3	8.61	9.18
4	9.64	10.38
5	10.35	11.35
[0176] 6	9.12	10.51
7	8.65	9.31
8	10.34	8.19
9	11.67	11.55
10	8.43	10.37
平均值	9.865	9.85
变异系数 (CV)	11.89%	12.04%

[0177] 用血清淀粉样蛋白 A 的 cutoff 值 10mg/L 的标准品作为样本,按上述两种反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示其加指示剂和不加指示剂 CV 分别为 11.89% 和 12.04%;以 $(1 - \text{平均值} / \text{标示值}) * 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,分别为 1.35% 和 1.50%。

[0178] 2. 考察两种反应板稳定性

[0179] 将加入指示剂的反应板与不加指示剂的反应板分别放置在 2-8℃ 和 37℃,用血清淀粉样蛋白 A 标准品 10mg/L 测试,各重复测定 3 次,测试均值与起始均值相差 $\leq 20\%$ 为稳定性合格,考察稳定性。

[0180] 表 22

	反应板种类	测试平均值			
		2-8℃3天	37℃3天	2-8℃7天	37℃7天
[0181]	不加指示剂	10.32	9.28	11.05	10.28
	加指示剂	9.46	10.73	9.34	9.81
	结论	稳定		稳定	

[0182] 3. 考察两种反应板线性范围

[0183] 将两种反应板测试不同浓度的血清淀粉样蛋白 A 标准品, 每种标准品各测试 3 次取平均值。将两种反应板进行比对, 比对方程为 $y=1.041x-0.749$, 相关系数 $R=0.999$, 说明这两种反应板无显著性差异。结果如图 6 和表 23。

[0184] 表 23

	测试浓度	加入指示剂	不加指示剂
	8mg/L	8.76	8.03
	10mg/L	10.12	9.28
[0185]	50 mg/L	47.69	49.32
	100 mg/L	97.68	102.67
	150 mg/L	146.87	151.12

[0186] 用百里酚蓝(麝香草酚蓝)、溴百里酚蓝、溴甲酚绿、甲基橙、甲基红或者甲基橙代替溴酚蓝, 效果与溴酚蓝相似, 在点样缓冲液中的含量最低可达 0.0005wt%。

[0187] 使用酚酞、刚果红代替溴酚蓝时, 显色不明显或者封闭液冲洗的效果不好。

[0188] (三) 用显色指示剂质控的反应板可改进精度和偏差

[0189] 按照(一)的方法点样制备血清淀粉样蛋白 A (SAA) 检测试剂盒, 并根据点样的形状、大小、均匀度, 从而进行质控, 剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试样条。

[0190] 对照 1 为正常生产未经过挑选的反应板, 对照 2 是点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板, 测试组为经过挑选的未偏移、没有不规则或不均匀形状的反应板, 每组各 10 个, 比较三者的检测结果, 结果如表 24。

[0191] 表 24

	序号	对照 1	对照 2	质控
	1	8.61	8.64	10.15
	2	10.61	9.43	11.34
	3	8.73	11.52	10.65
	4	8.2	11.55	9.45
	5	10.58	11.24	10.62
[0192]	6	10.84	11.68	8.74
	7	9.55	8.43	10.57
	8	8.61	8.96	9.88
	9	10.38	9.65	10.62
	10	8.34	8.02	8.94
	平均值	9.45	9.912	10.1
	变异系数 (CV)	11.25%	14.57%	8.27%

[0193] 用血清淀粉样蛋白 A 的 cutoff 值 10mg/L 的标准品作为样本,按上述三种质控和对照反应板按照试剂盒检测样品所述方法测定,各测定 10 次,分别计算平均值和变异系数 CV。其中,计算 CV 进行重复性考察,结果显示质控筛选后的反应板、对照未经筛选的反应板和全是不均匀或不规则的反应板测试 CV 分别为 8.27%、11.25% 和 14.57%,CV 明显改善。由此可见,通过上述方法,可对点样的结果进行质控,减少检测偏差,提高精度。

[0194] 还可以用肌钙蛋白抗体、脑钠肽前体抗体、肌红蛋白抗体或结核分支杆菌抗原代替实施例 1~6 中的抗体或抗原,检测结果显示,在点样缓冲液中加入溴酚蓝、百里酚蓝(麝香草酚蓝)、溴百里酚蓝、溴甲酚绿、甲基橙、甲基红或者甲基橙,不影响检测试剂盒的重复性、稳定性及线性范围,但是进行质控筛选,剔除点样位置偏移大、形状不规则或不均匀的反应板或试样条后, CV 值从 12% 左右降至 8% 左右,有明显改善。

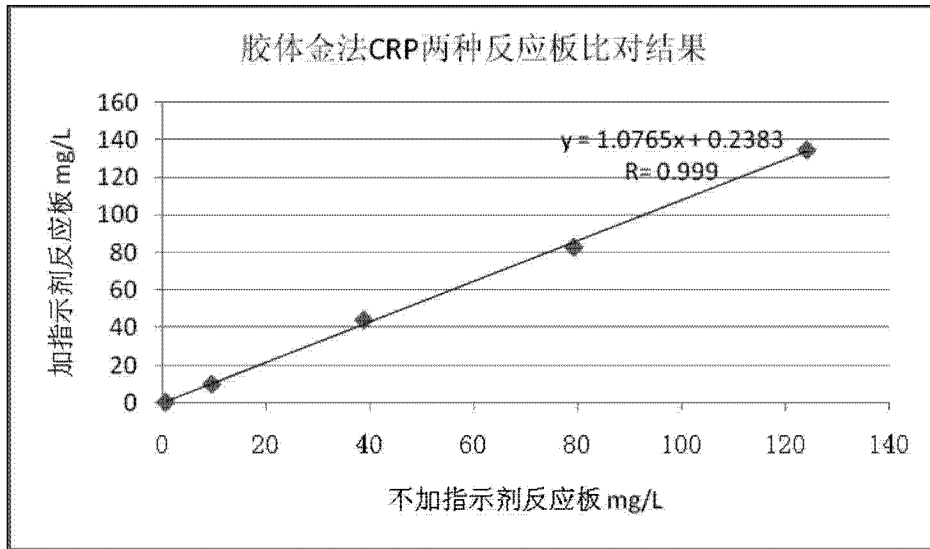


图 1

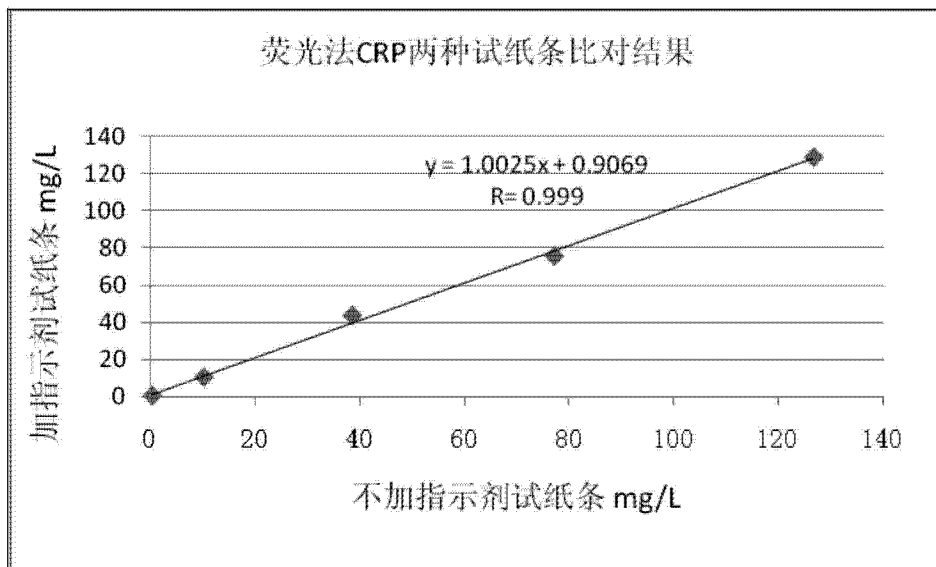


图 2

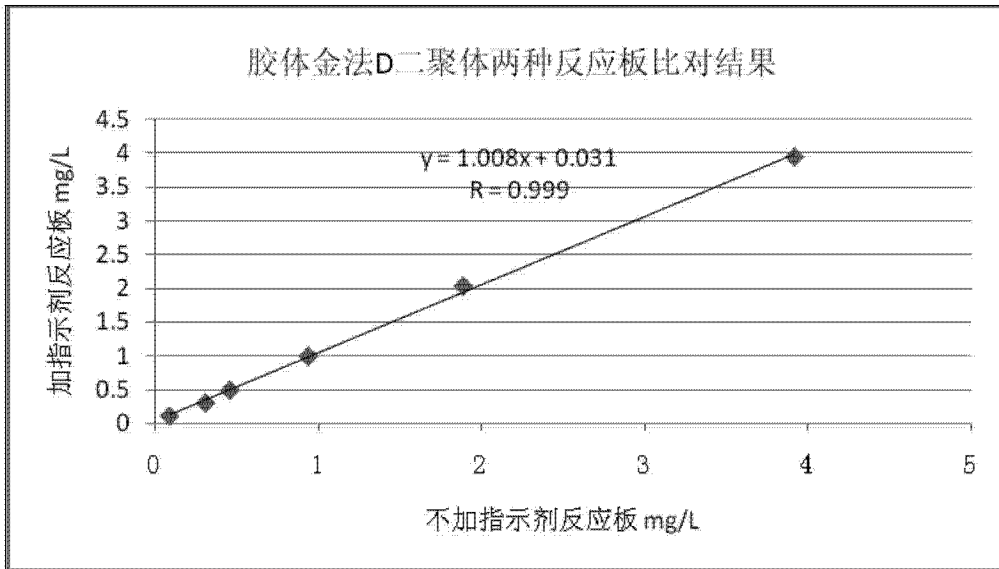


图 3

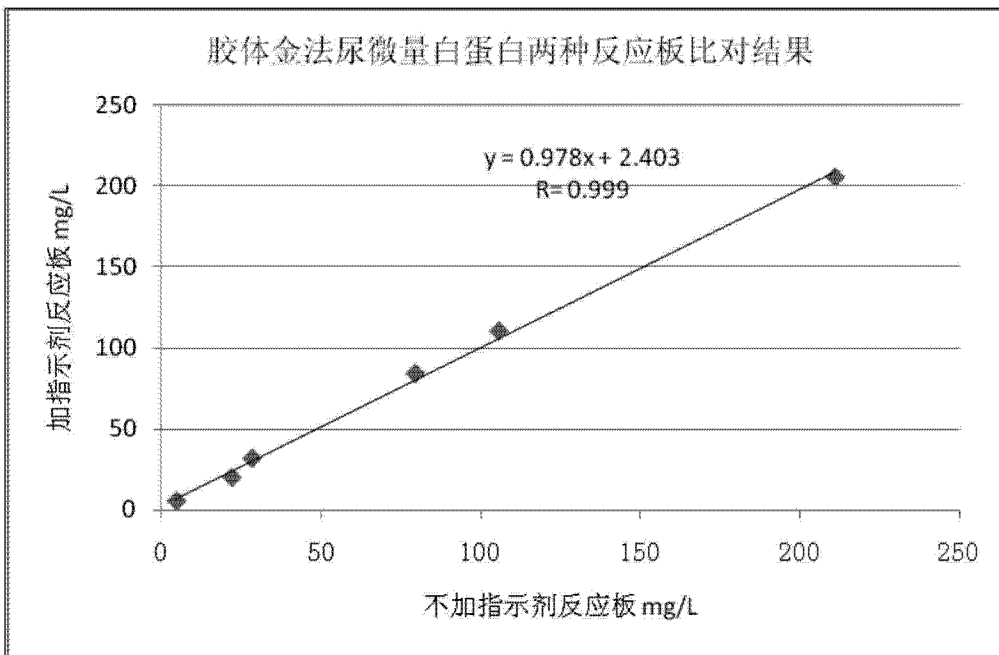


图 4

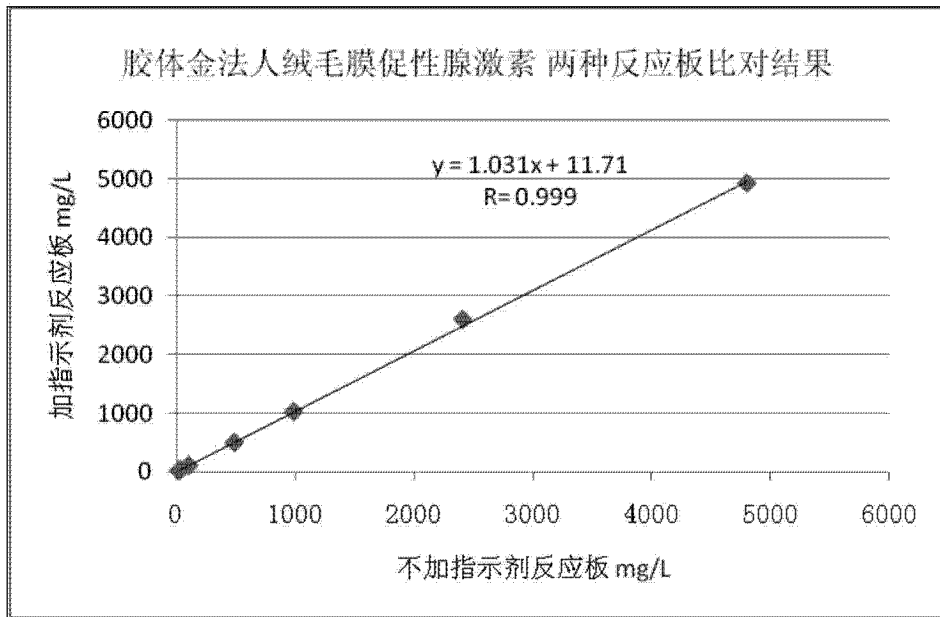


图 5

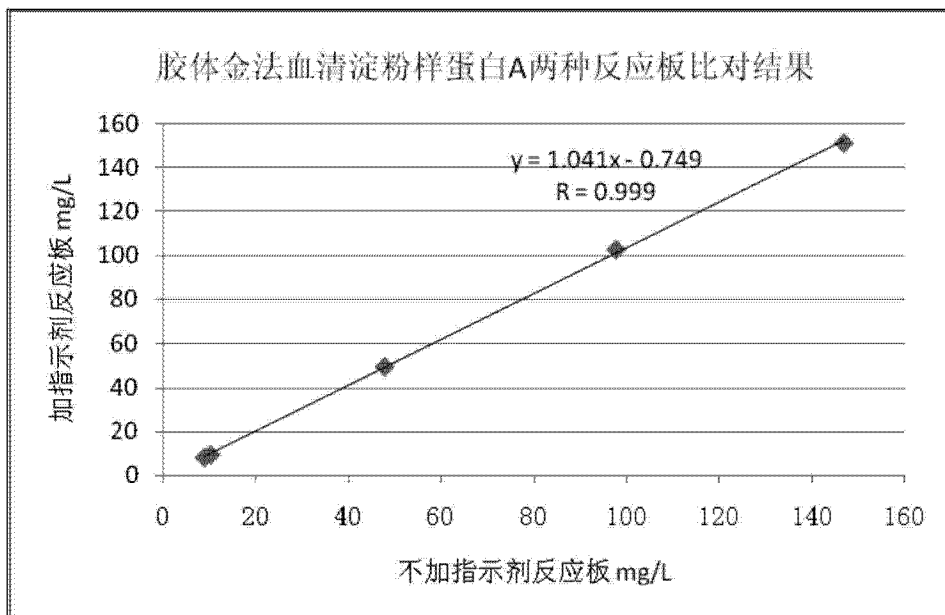


图 6

专利名称(译)	一种诊断试剂盒的点样方法		
公开(公告)号	CN103869059A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410120353.5	申请日	2014-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
[标]发明人	杨晶 翟小杰 沈旭辉		
发明人	杨晶 翟小杰 沈旭辉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/76		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/6827 G01N33/76 G01N2333/4737 G01N2333/59		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于诊断试剂领域，具体为将显色指示剂用于制备诊断试剂。将含有生物原料的点样缓冲液喷涂或者包被在基质上，点样缓冲液中还含有显色指示剂。运用该点样方法，可明显区分在生产操作中的中间品是否进行点样操作，有利于在点样过程中即去除不符合产品标准的中间品，也有利于点样过程中对异常情况的及时发现处理，提高生产效率，降低生产过程中错误率。

