



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106855571 A

(43)申请公布日 2017.06.16

(21)申请号 201611248706.5

(22)申请日 2016.12.29

(71)申请人 广州华弘生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城伴河路84号自编二栋
101

(72)发明人 陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥
母润红 王涛 苏焱

(74)专利代理机构 北京精金石专利代理事务所
(普通合伙) 11470

代理人 刘晔

(51) Int. Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒及其
使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种抗链球菌溶血素O快速诊断
试剂盒及其使用方法,该试剂盒包含样本处理
液、反应缓冲液、胶体金标记稳定液、标准品、清
洗液。其中,所述的胶体金标记稳定液为含2~
8%(w/v)三羟甲基甲胺基乙磺酸、0.02~0.1%
(w/v)叠氮化钠、0.1~0.2%(w/v)吐温-20、2~
6%(w/v)海藻酸钠、1~2%(w/v)甘氨酸的胶体
金标记链球菌溶血素O溶液。与常规的胶乳增强
免疫比浊法比较,本发明提供的抗链球菌溶血素
O试剂盒大大提高了检测的特异性和灵敏度,最
低检测限可达到0.1ng/ml,且与干扰物质交叉反
应小,具有较宽的检测线性范围,线性范围可达
0.1~500ng/ml,检测结果可靠。

1. 一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含样本处理液、反应缓冲液、胶体金标记稳定液、标准品、清洗液。

2. 根据权利要求1所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的胶体金标记稳定液为含2~8% (w/v) 三羟甲基氨基乙磺酸、0.02~0.1% (w/v) 叠氮化钠、0.1~0.2% (w/v) 吐温-20、2~6% (w/v) 海藻酸钠、1~2% (w/v) 甘氨酸的胶体金标记链球菌溶血素O溶液。

3. 根据权利要求2所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备包括以下步骤:

(1) 胶体金的制备:

①取100mL质量浓度为0.01%的四氯金酸水溶液与1mL聚乙二醇4000混合,加热至沸腾,保持沸腾3min,在1000r/min搅拌速度下,迅速加入2mL还原剂溶液,在搅拌下继续加热,直至溶液变成橘红色为止,冷却,即得胶体金溶液;

②取20mL含25mmol/L EDTA,质量分数为75%的蔗糖溶液置于50mL的离心管中,然后加入10mL含25mmol/L EDTA,质量分数为50%的蔗糖溶液,静置10min,然后取10mL步骤①制得的胶体金溶液缓慢加入到离心管中,平衡后在4℃,2000r/min离心15~20min,收集处于75%的蔗糖与50%的蔗糖界面中的胶体金,即得;

(2) 胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备:

①链球菌溶血素O用量确定:取1mL步骤(1)制得的胶体金,使用0.1mol/L的醋酸溶液调节pH至7.5~8.5,加入0.1mL 10%的氯化钠溶液,混匀,然后加入不同体积的链球菌溶血素O溶液,混匀,静置1h,观察是否有颜色改变或沉淀析出,当出现由红变蓝的聚沉现象,表明加入的链球菌溶血素O的用量不足,当无颜色改变且无沉淀析出,表明加入的链球菌溶血素O的用量为制备胶体金标记链球菌溶血素O溶液所需的链球菌溶血素O稳定用量;

②胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备:取10mL步骤(1)制得的胶体金,使用0.1mol/L的醋酸溶液调节pH至7.5~8.5,加入1mL 10%的氯化钠溶液,加入10倍步骤①确定的制备胶体金标记链球菌溶血素O溶液所需的链球菌溶血素O稳定用量,混匀,反应10min,然后将反应液使用Sephadex G-200柱进行纯化,即得胶体金标记链球菌溶血素O溶液。

4. 根据权利要求3所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述步骤(1)胶体金的制备中还原剂溶液的制备为:取10mL质量浓度为1%的抗坏血酸、6mL质量浓度为1%的鞣酸、1mL 0.2mol/L碳酸氢钾溶液和2mL双蒸水,混合,即得。

5. 根据权利要求1所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的反应缓冲液组成为:4~12% (w/v) 2-(N-吗啡啉)乙磺酸、2~4% (w/v) BSA、0.1~0.2% (w/v) 吐温-20、0.01~0.1% (w/v) 叠氮化钠、1~2% (w/v) 乙二醇和2~8% (w/v) PEG6000。

6. 根据权利要求1所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的样本处理液为含有0.05~0.1% (w/v) 乙二胺四乙酸钠、0.5~1% (v/v) Triton X-100、0.05~0.1% (w/v) Proclin 300、且浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液。

7. 根据权利要求1所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的清洗液组为含0.1% (w/v) 吐温-20、0.1mol/L氯化钠,且浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液。

8. 根据权利要求1所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其特征在于,所述的标准

品的制备为:

使用含0.1mol/L氯化钠、2% (w/v) BSA, pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液将链球菌溶血素O抗体配制成浓度分别为5, 25, 50, 125, 250, 500ng/ml的标准液, 即得。

9. 根据权利要求1-8任一所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒的使用方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 取2.5 μ L校准品, 加入150 μ L反应缓冲液, 混匀, 于37 $^{\circ}$ C恒温5min, 然后向混合体系中加入30 μ L胶体金标记稳定液, 混匀, 于37 $^{\circ}$ C恒温5min, 空白管调零, 在检测波长为540 \pm 10nm、检测温度为37 $^{\circ}$ C的条件下测定吸光度, 根据不同浓度校准品测得的吸光度值和相应的浓度值制定标准曲线;

(2) 取2.5 μ L待测样品, 按照步骤(1)的条件进行吸光度测定, 将测得的吸光度值代入标准曲线, 对应的浓度值即为待测物的浓度。

一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学生物类免疫检测试剂领域,具体涉及一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 链球菌溶血素O是A群溶血性链球菌的代谢产物,它是一种具有溶血活性的蛋白质,并且是一种强抗原物质。人感染溶血性链球菌2~3周后,即可产生抗链球菌溶血素O(ASO)。此种抗体的显著递增与急性风湿热、急性肾小球肾炎、风湿性心脏病、风湿性关节炎或急性肾脏病变等密切相关,持续存在或水平下降则提示疾病为非活动期或恢复期,临床动态监测ASO具有重要意义。

[0003] 目前常用的检测ASO的方法有:1)点免疫结合法、2)溶血抑制法、3)胶乳凝集法、4)酶联免疫法、5)胶乳增强免疫比浊法。

[0004] 其中,点免疫结合法以硝酸纤维素薄膜为固相载体,把链球菌溶血素O抗原点在硝酸纤维素薄膜上,未点抗原的部分用吐温20封闭,固定在硝酸纤维素薄膜上的抗原与被检测血清中的抗链球菌溶血素O抗体反应,然后再与过氧化物酶标记的马抗人免疫球蛋白IgG反应,过氧化物酶的存在与否则用含有盐酸联苯胺和过氧化氢的底物检测,阳性反应点上由于形成有色的沉淀而把硝酸纤维素薄膜染成蓝褐色。可通过目测判断反应结果,但该方法只能定性不能进行定量。

[0005] 溶血抑制法依据还原剂助溶血素O能溶解红细胞的特性,通过观察ASO中和溶血素O的溶血作用,定量检测ASO,该方法较敏感,但操作繁琐,试验影响因素较多,结果重复性欠佳。

[0006] 胶乳凝集法依据被测血清中若有高滴度的ASO,在与ASO胶乳反应时会引起后者凝集,如预先用25结合单位/ml溶血素“O”中和后,不出现凝集者说明血清中ASO<250单位,为阴性,仍出现凝集者说明血清中的ASO>250单位,为阳性,但其灵敏度低,特异性差,假阳性率高,已远不能满足临床诊断、治疗及预后的需要。

[0007] 酶联免疫法依据抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物显色,用酶标仪测定吸光度,通过标准曲线计算样品中抗链球菌溶血素O抗体的含量,但该方法重复性较差,精密度较低,且容易受到酶稳定性的影响。

[0008] 胶乳增强免疫比浊法可定量测定血清中ASO含量,是当前国内外检测ASO常用的手段,该方法以大小均一且表面包被有链球菌溶血素O的聚苯乙烯乳胶颗粒悬液为检测试剂,当含有ASO的样品与该试剂混合时,发生明显的抗原-抗体凝集反应,通过测定570nm处吸光度值的变化,计算出样品中ASO抗体的含量。如公开号为CN 104483492A的中国专利申请公开了一种抗链球菌溶血素O抗体的检测试剂盒,该试剂盒首先利用化学交联法将惰性蛋白(牛血清白蛋白)与链球菌溶血素O结合,制得稳定性好的组合蛋白,再利用化学交联法将组合蛋白与胶乳颗粒进行交联,制成链球菌溶血素O-牛血清白蛋白-胶乳颗粒复合物,通过检测抗原抗体之间的免疫反应形成的浊度,定量检测ASO的含量。采用胶乳增强免疫比浊法对

ASO进行检测,具有重复性好,自动化程度高,操作简便快速,但其检测的灵敏度和检测特异性有待提高。

发明内容

[0009] 为解决现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,采用该试剂盒进行抗链球菌溶血素O检测具有较高的灵敏度和特异性,且操作简单,操作流程短。

[0010] 本发明另外一个目的在于提供一种所述抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒的使用方法。

[0011] 本发明的上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0012] 本发明提供了一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒,其包含样本处理液、反应缓冲液、胶体金标记稳定液、标准品、清洗液。

[0013] 其中,所述的胶体金标记稳定液为含2~8% (w/v) 三羟甲基氨基乙磺酸、0.02~0.1% (w/v) 叠氮化钠、0.1~0.2% (w/v) 吐温-20、2~6% (w/v) 海藻酸钠、1~2% (w/v) 甘氨酸的胶体金标记链球菌溶血素O溶液。

[0014] 进一步地,所述的胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备包括以下步骤:

[0015] (1) 胶体金的制备:

[0016] ①取100mL质量浓度为0.01%的四氯金酸水溶液与1mL聚乙二醇4000混合,加热至沸腾,保持沸腾3min,在1000r/min搅拌速度下,迅速加入2mL还原剂溶液,在搅拌下继续加热,直至溶液变成橘红色为止,冷却,即得胶体金溶液;

[0017] ②取20mL含25mmol/L EDTA,质量分数为75%的蔗糖溶液置于50mL的离心管中,然后加入10mL含25mmol/L EDTA,质量分数为50%的蔗糖溶液,静置10min,然后取10mL步骤①制得的胶体金溶液缓慢加入到离心管中,平衡后在4℃,2000r/min离心15~20min,收集处于75%的蔗糖与50%的蔗糖界面中的胶体金,即得;

[0018] (2) 胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备:

[0019] ①链球菌溶血素O用量确定:取1mL步骤(1)制得的胶体金,使用0.1mol/L的醋酸溶液调节pH至7.5~8.5,加入0.1mL 10%的氯化钠溶液,混匀,然后加入不同体积的链球菌溶血素O溶液,混匀,静置1h,观察是否有颜色改变或沉淀析出,当出现由红变蓝的聚沉现象,表明加入的链球菌溶血素O的用量不足,当无颜色改变且无沉淀析出,表明加入的链球菌溶血素O的用量为制备胶体金标记链球菌溶血素O溶液所需的链球菌溶血素O稳定用量;

[0020] ②胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备:取10mL步骤(1)制得的胶体金,使用0.1mol/L的醋酸溶液调节pH至7.5~8.5,加入1mL 10%的氯化钠溶液,加入10倍步骤①确定的制备胶体金标记链球菌溶血素O溶液所需的链球菌溶血素O稳定用量,混匀,反应10min,然后将反应液使用Sephadex G-200柱进行纯化,即得胶体金标记链球菌溶血素O溶液。

[0021] 上述步骤(1)胶体金的制备中还原剂溶液的制备为:取10mL质量浓度为1%的抗坏血酸、6mL质量浓度为1%的鞣酸、1mL 0.2mol/L碳酸氢钾溶液和2mL双蒸水,混合,即得。

[0022] 上述使用Sephadex G-200柱对反应液进行纯化的可以采用本领域常用的技术条件:如采用常规的层析柱,使用蠕动泵将反应液铺加于凝胶床上,使用0.02M Tris-HCl缓冲

液,以1mL/10min的流速进行洗脱。

[0023] 采用蔗糖密度梯度对制得的胶体金进行筛选,使胶体金颗粒更为均匀,接近均相体系,然后将链球菌溶血素O抗原结合在大小均一的胶体金表面上,大大增加了试剂盒检测的灵敏度和稳定性。

[0024] 进一步地,所述的反应缓冲液组成为:4~12% (w/v) 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸、2~4% (w/v) BSA、0.1~0.2% (w/v) 吐温-20、0.01~0.1% (w/v) 叠氮化钠、1~2% (w/v) 乙二醇和2~8% (w/v) PEG6000。

[0025] 进一步地,所述的清洗液组为含0.1% (w/v) 吐温-20、0.1mol/L氯化钠,且浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液。

[0026] 此外,本发明还提供一种样本处理液的配方,经所述样本处理液对待测血清进行处理,可降低血清中其他蛋白质的干扰,提高检测灵敏度,使检测结果更为可靠。所述的样本处理液为含有0.05~0.1% (w/v) 乙二胺四乙酸钠、0.5~1% (v/v) Triton X-100、0.05~0.1% (w/v) Proclin 300、且浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液。

[0027] 所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒还包含一系列不同浓度的标准品,所述的标准品制备为:使用含0.1mol/L氯化钠、2% (w/v) BSA,pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液将链球菌溶血素O抗体配制成浓度分别为5,25,50,125,250,500ng/ml的标准液,即得。

[0028] 本发明试剂盒检测抗链球菌溶血素O的原理是:利用胶体金接近均相的颗粒特性,将特定的链球菌溶血素O标记于胶体金颗粒表面,当检测系统或检测环境中存在抗链球菌溶血素O时,胶体金颗粒表面的抗原即将与之对应的抗体捕获,并形成抗原-抗体复合物,进而造成局部胶体金颗粒的聚合或堆积,使胶体金均相试剂透光光谱由红色向蓝色光谱移动,这种移动主要反应为540nm处吸光度的降低和660nm处吸光度的升高,从而达到定量检测血清中抗链球菌溶血素O的目的。

[0029] 此外,本发明还提供一种所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒的使用方法,其包括以下步骤:

[0030] (1) 取2.5μL校准品,加入150μL反应缓冲液,混匀,于37℃恒温5min,然后向混合体系中加入30μL胶体金标记稳定液,混匀,于37℃恒温5min,空白管调零,在检测波长为540±10nm、检测温度为37℃的条件下测定吸光度,根据不同浓度校准品测得的吸光度值和相应的浓度值制定标准曲线;

[0031] (2) 取2.5μL待测样品,按照步骤(1)的条件进行吸光度测定,将测得的吸光度值代入标准曲线,对应的浓度值即为待测物的浓度。

[0032] 本发明试剂盒中未提及的试剂盒的外包装以及各试剂组分的独立包装容器等均可按照所属领域的常规操作进行,符合相关行业规定即可。本发明的方法中未详细提及的操作步骤也可参照所属领域的常规操作进行,所用检测仪器设备,如分光光度计、半自动生化分析仪和全自动生化分析仪等仪器的使用均按说明书操作进行。

[0033] 与现有技术相比,本发明的优势在于:

[0034] (1) 与常规的胶乳增强免疫比浊法比较,本发明提供的抗链球菌溶血素O试剂盒大大提高了检测的特异性和灵敏度,最低检测限可达到0.1ng/ml,且与干扰物质交叉反应小,具有较宽的检测线性范围,线性范围可达0.1~500ng/ml,检测结果可靠。

[0035] (2) 分别采用本发明提供的试剂盒与Sanofi-Aventis QM300免疫比浊法试剂盒对

抗链球菌溶血素O进行检测,两者测定值接近,相关系数为0.9985,表明两种方法具有良好的相关性,但本发明制备的试剂盒大大提高了对链球菌溶血素O抗体分析的灵敏度和精密程度,且成本远低于进口试剂,适合大规模推广和应用。

[0036] (3) 本发明提供的试剂盒适用于普通的分光光度计、半自动生化分析仪和全自动生化分析仪等仪器的使用,不需要特殊的检测设备,满足临床的检测需求,且操作简单,耗时少,大大提高检测的效率。

具体实施方式

[0037] 以下通过具体实施方式进一步描述本发明,但本发明不仅仅限于以下实施例。

[0038] 实施例1本发明检测试剂盒的组成与制备

[0039] 本发明所述的试剂盒包括以下组分:

[0040] 试剂a:样本处理液

[0041] 试剂b:反应缓冲液

[0042] 试剂c:胶体金标记稳定液

[0043] 试剂d:标准品

[0044] 试剂e:清洗液

[0045] 本发明试剂盒中各试剂的制备包括以下步骤:

[0046] 1. 样本处理液的制备

[0047] 本发明所述的样本处理液为含有0.1% (w/v) 乙二胺四乙酸钠、0.5% (v/v) Triton X-100、0.1% (w/v) Proclin 300、且浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,制备方法:以配制100ml样本处理液为例:

[0048] ①取0.599g磷酸二氢钠溶于100ml水中,制成浓度为0.05mol/L的磷酸二氢钠溶液,另取0.710g磷酸氢二钠溶于100ml水中,制成浓度为0.05mol/L的磷酸氢二钠溶液,分别取0.05mol/L的磷酸二氢钠溶液28ml,0.05mol/L的磷酸氢二钠溶液72ml,混合,制得浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液。

[0049] ②取0.1g乙二胺四乙酸钠、0.5mL Triton X-100和0.1g Proclin 300溶于100ml步骤①制得的浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,即得。

[0050] 2. 反应缓冲液的制备

[0051] 本发明所述的反应缓冲液组成为:10% (w/v) 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸、2% (w/v) BSA、0.1% (w/v) 吐温-20、0.02% (w/v) 叠氮化钠、1% (w/v) 乙二醇和6% (w/v) PEG6000;

[0052] 制备方法:以配制100ml反应缓冲液为例:

[0053] 取10g 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸、2g BSA、0.1g吐温-20、0.02g叠氮化钠、1g乙二醇和6gPEG6000,溶于100ml的纯化水中,即得。

[0054] 3. 胶体金标记稳定液的制备

[0055] 本发明所述的胶体金标记稳定液为含8% (w/v) 三羟甲基甲胺基乙磺酸、0.02% (w/v) 叠氮化钠、0.1% (w/v) 吐温-20、6% (w/v) 海藻酸钠、1% (w/v) 甘氨酸的胶体金标记链球菌溶血素O溶液,制备方法:

[0056] (1) 胶体金的制备

[0057] ①取100mL质量浓度为0.01%的四氯金酸水溶液与1mL聚乙二醇4000混合,加热至

沸腾,保持沸腾3min,在1000r/min搅拌速度下,迅速加入2mL还原剂溶液,在搅拌下继续加热,直至溶液变成橘红色为止,冷却,即得胶体金溶液;

[0058] ②取20mL含25mmol/L EDTA,质量分数为75%的蔗糖溶液置于50mL的离心管中,然后加入10mL含25mmol/L EDTA,质量分数为50%的蔗糖溶液,静置10min,然后取10mL步骤①制得的胶体金溶液缓慢加入到离心管中,平衡后在4℃,2000r/min离心20min,收集处于75%的蔗糖与50%的蔗糖界面中的胶体金,即得;

[0059] 其中,步骤(1)胶体金的制备中还原剂溶液的制备为:取10mL质量浓度为1%的抗坏血酸、6mL质量浓度为1%的鞣酸、1mL 0.2mol/L碳酸氢钾溶液和2mL双蒸水,混合,即得。

[0060] (2)胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备:

[0061] ①链球菌溶血素O用量确定:取1mL步骤(1)制得的胶体金,使用0.1mol/L的醋酸溶液调节pH至7.5,加入0.1mL 10%的氯化钠溶液,混匀,然后加入不同体积的链球菌溶血素O溶液,混匀,静置1h,观察是否有颜色改变或沉淀析出,当出现由红变蓝的聚沉现象,表明加入的链球菌溶血素O的用量不足,当无颜色改变且无沉淀析出,表明加入的链球菌溶血素O的用量为制备胶体金标记链球菌溶血素O溶液所需的链球菌溶血素O稳定用量;

[0062] ②胶体金标记链球菌溶血素O溶液的制备:取10mL步骤(1)制得的胶体金,使用0.1mol/L的醋酸溶液调节pH至7.5,加入1mL 10%的氯化钠溶液,加入10倍步骤①确定的制备胶体金标记链球菌溶血素O溶液所需的链球菌溶血素O稳定用量,混匀,反应10min,然后将反应液使用Sephadex G-200柱进行纯化,即得胶体金标记链球菌溶血素O溶液,

[0063] (3)胶体金标记稳定液的制备

[0064] 取8g三羟甲基甲胺基乙磺酸、0.02g叠氮化钠、0.1g吐温-20、6g海藻酸钠和1g甘氨酸,溶于100ml的步骤(2)制得的胶体金标记链球菌溶血素O溶液中,即得。

[0065] 4.标准品的制备

[0066] 使用含0.1mol/L氯化钠、2% (w/v) BSA,pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液将链球菌溶血素O抗体配制成浓度分别为5,25,50,125,250,500ng/ml的标准液,即得。

[0067] 5.清洗液的制备

[0068] 本发明所述的清洗液组为含0.1% (w/v) 吐温-20、0.1mol/L氯化钠,且浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液;

[0069] 制备方法:以配制100ml清洗液为例:

[0070] ①取0.599g磷酸二氢钠溶于100ml水中,制成浓度为0.05mol/L的磷酸二氢钠溶液,另取0.710g磷酸氢二钠溶于100ml水中,制成浓度为0.05mol/L的磷酸氢二钠溶液,分别取0.05mol/L的磷酸二氢钠溶液28ml,0.05mol/L的磷酸氢二钠溶液72ml,混合,制得浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液。

[0071] ②取0.1g吐温-20、0.58g氯化钠,加入100ml浓度为0.05mol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,搅拌均匀即得。

[0072] 实施例2本发明检测试剂盒的检测方法

[0073] 本发明所述的抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒的检测方法,其包括以下步骤:

[0074] (1)取2.5μL校准品,加入150μL反应缓冲液,混匀,于37℃恒温5min,然后向混合体系中加入30μL胶体金标记稳定液,混匀,于37℃恒温5min,空白管调零,在检测波长为540±10nm、检测温度为37℃的条件下测定吸光度,根据不同浓度校准品测得的吸光度值和相应

的浓度值制定标准曲线；

[0075] (2)取2.5 μ L待测样品,按照步骤(1)的条件进行吸光度测定,将测得的吸光度值代入标准曲线,对应的浓度值即为待测物的浓度。

[0076] 实施例3本发明检测试剂盒的方法学检定

[0077] 按照本领域中常规的制造和检定规程对实施例中制备成的检测试剂盒进行检定,结果如下:

[0078] ①分析灵敏度

[0079] 重复测定零校准品(或样本稀释液)不少于10次,计算出反应量的均值(x)和标准差(s),将(x+2s)的反应量代入剂量-反应曲线,计算出相应浓度值,即为最低检出限,所得自制试剂盒的最低检出限为0.1ng/ml。

[0080] ②线性关系

[0081] 以自制试剂盒中参考标准品浓度的对数为横坐标,信号值计数的对数为纵坐标,由双对数数学模型Log-Log函数处理,测得抗链球菌溶血素O试剂盒剂量-反应曲线线性方程为 $Y=1.027X-6.537$,相关系数为 $r=0.9992$,表明自制试剂盒在浓度为5-500ng/ml的范围内具有良好的剂量反应线性关系。

[0082] ③精密度

[0083] 以自制试剂盒中3个不同浓度的参考标准品进行测定(高、中、低浓度分别为50ng/ml、250ng/ml、500ng/ml),各设10个复孔。分别对同一批次和不同批次的自制试剂盒中3个不同浓度的参考标准品进行重复测定10次。并计算测量值的平均值和标准差,按照公式计算变异系数 $CV = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100\%$,结果自制试剂盒的批内变异系数(CV%)为1.0~2.8%,批间变异系数(CV%)为2.1~4.5%,符合试剂盒检定规程要求,精密度良好。

[0084] ④特异性

[0085] 以血红蛋白200ng/ml、类风湿因子100ng/ml作为待测样品,用自制的抗链球菌溶血素O试剂盒测定,检测结果分别为4ng/ml、1ng/ml,无明显的交叉反应,表明自制的试剂盒对检测链球菌溶血素O特异性高。

[0086] ⑤稳定性

[0087] 将自制的检测试剂盒置于37 $^{\circ}$ C分别热处理0天、3天、5天和7天,在不同的处理时间之后分别测定链球菌溶血素O校准品,各时间点的试剂盒信号值变化不大,线性关系良好,表明本发明检测试剂盒具有良好的热稳定性。

[0088] ⑥准确度

[0089] 对链球菌溶血素O浓度为50ng/ml和250ng/ml的质控品溶液进行检测,每个做4个平行,分别计算回收率,回收率=实测值/添加值 $\times 100\%$,回收率均在 $101.5 \pm 1.02\%$ 。

[0090] 实施例4本发明自制试剂盒与法国Sanofi-Aventis QM300免疫比浊法试剂盒对抗链球菌溶血素O进行检测的结果比较

[0091] 分别采用本发明自制的试剂盒和法国Sanofi-Aventis QM300免疫比浊法试剂盒同时对急性风湿热病人血清样本30份、急性肾小球肾炎病人血清样本20份进行检测。其中,本发明自制试剂盒按照实施例2的方法进行操作,Sanofi-Aventis公司的QM300免疫比浊法试剂盒按照说明书进行操作,分别检测血清中的链球菌溶血素O抗体的分析灵敏度、精密度、稳定性和线性范围,结果见下表。并以自制试剂盒测定的结果为横坐标,Sanofi-

Aventis公司的QM300免疫比浊法试剂盒测定的结果为纵坐标做回归分析,相关方程为: $Y=1.015X-0.382$,相关系数 $r=0.9985$ 。结果表明两种方法具有同样的使用价值,但本发明制备的试剂盒大大提高了对链球菌溶血素O抗体分析的灵敏度和精密度,且操作简便、快速、更易于推广。

试剂盒		自制试剂盒	QM300 免疫比浊法试剂盒
[0092]	最低检测限 (ng/ml)	0.1	1
	线性范围 (ng/ml)	0.1-500	1-350
[0093]	精密度		
	批内	< 3.0%	< 5.0%
	批间	< 5.0%	< 7.0%

[0094] 对比例1试剂盒和本发明实施例1制得的试剂盒对抗链球菌溶血素O进行检测的结果比较

[0095] 本发明对比例1试剂盒的制备与实施例1试剂盒的制备步骤基本相同,区别在于胶体金的制备过程中,不使用蔗糖密度梯度法对制得的胶体金进行筛选,即省略胶体金制备中的步骤②,直接将制得的胶体金,进行胶体金标记链球菌溶血素O溶液制备。

[0096] 对比例1试剂盒的使用方法参考实施例2具体的步骤。

[0097] 分别采用对比例1试剂盒和实施例1试剂盒同时对急性风湿热病人血清样本30份、急性肾小球肾炎病人血清样本20份进行检测,结果见下表。

试剂盒		实施例 1 试剂盒	对比例 1 试剂盒
[0098]	最低检测限 (ng/ml)	0.1	1
	线性范围 (ng/ml)	0.1-500	1-500
	精密度		
	批内	< 3.0%	< 4.5%
	批间	< 5.0%	< 6.0%

[0099] 结果表明,采用蔗糖密度梯度对制得的胶体金进行筛选,使胶体金颗粒更为均匀,接近均相体系,然后将链球菌溶血素O抗原结合在大小均一的胶体金表面上,大大增加了试剂盒检测的灵敏度和精密度。

[0100] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN106855571A	公开(公告)日	2017-06-16
申请号	CN201611248706.5	申请日	2016-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
[标]发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
IPC分类号	G01N33/536 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/536 G01N21/31		
代理人(译)	刘晔		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种抗链球菌溶血素O快速诊断试剂盒及其使用方法，该试剂盒包含样本处理液、反应缓冲液、胶体金标记稳定液、标准品、清洗液。其中，所述的胶体金标记稳定液为含2~8%(w/v)三羟甲基甲胺基乙磺酸、0.02~0.1%(w/v)叠氮化钠、0.1~0.2%(w/v)吐温-20、2~6%(w/v)海藻酸钠、1~2%(w/v)甘氨酸的胶体金标记链球菌溶血素O溶液。与常规的胶乳增强免疫比浊法比较，本发明提供的抗链球菌溶血素O试剂盒大大提高了检测的特异性和灵敏度，最低检测限可达到0.1ng/ml，且与干扰物质交叉反应小，具有较宽的检测线性范围，线性范围可达0.1~500ng/ml，检测结果可靠。

试剂盒	自制试剂盒	QM300 免疫比浊法试剂盒
最低检测限 (ng/ml)	0.1	1
线性范围 (ng/ml)	0.1-500	1-350