



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112557643 A

(43)申请公布日 2021.03.26

(21)申请号 201910930062.5

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 菲鹏生物股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区西丽留
仙洞中山园路1001号TCL科学园区研
发楼D2栋6层ABCD单元601;602;603;
604号房

申请人 广东菲鹏生物有限公司

(72)发明人 俞先 汤伟杰

(74)专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11463

代理人 徐乐

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

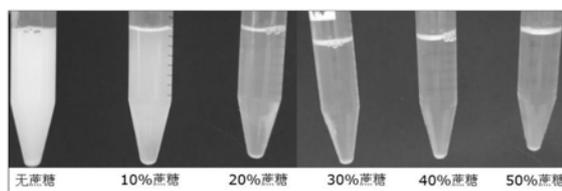
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

变性IgG和类风湿因子免疫抗原及制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,具体而言,提供了一种变性IgG和类风湿因子免疫抗原及制备方法。本发明提供的变性IgG的制备方法,在变性过程中添加蛋白保护剂,使IgG分子间保持一定距离,避免变性过程形成聚集,使得IgG变性更加充分,暴露更多的抗原表位,提高抗原活性。该方法使得变性过程稳定,得到的变性IgG单分散性好,变性充分,活性高。由于良好的改善了变性IgG的凝集问题,所以得到的类风湿因子免疫抗原稳定性更好,免疫抗原的活性得到显著提高,批间差变小,适合大规模生产。



1. 一种变性IgG的制备方法,其特征在于,在蛋白保护剂存在的条件下将IgG变性,得到变性IgG。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述蛋白保护剂包括二糖;
优选地,所述二糖包括蔗糖、海藻糖、麦芽糖或乳糖;
优选地,蛋白保护剂的最终用量为10-50w/v%,进一步优选为20-40w/v%。
3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,将IgG变性的方法包括热变性、强酸强碱变性、盐酸胍变性或尿素变性,优选为热变性。
4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述热变性包括: IgG在含有蛋白保护剂的缓冲液中加热变性,再降温和避光。
5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述IgG的含量为5-10mg/ml;
优选地,所述缓冲液包括HEPES缓冲液、MES缓冲液或PBS缓冲液,进一步优选为PBS缓冲液,更进一步优选为pH7.3-7.5PBS缓冲液;
优选地,所述加热变性的条件包括:在56-65℃条件下加热10-120min,优选为在60-63℃条件下加热30-90min;
优选地,所述降温和避光包括:在0-8℃条件下避光至少2h。
6. 权利要求1-5任一项所述的制备方法制备得到的变性IgG。
7. 权利要求6所述的变性IgG在制备免疫抗原中的应用。
8. 一种类风湿因子免疫抗原的制备方法,其特征在于,在蛋白保护剂存在的条件下,将抗原载体与权利要求6所述的变性IgG偶联,得到类风湿因子免疫抗原。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述抗原载体包括胶乳、胶体金或磁珠;
优选地,所述蛋白保护剂包括二糖;
优选地,所述二糖包括蔗糖、海藻糖、麦芽糖或乳糖。
10. 权利要求8或9所述的制备方法制备得到的类风湿因子免疫抗原。

变性IgG和类风湿因子免疫抗原及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种变性IgG和类风湿因子免疫抗原及制备方法。

背景技术

[0002] 类风湿因子(rheumatoid factor,RF)是一种以变性IgG为靶抗原的自身抗体,主要成分为IgM类型抗体,也有IgG类、IgA类、IgD类和IgE类。研究表明类风湿因子的阳性率在正常人中只有2%,老年人中有5%,而在类风湿关节炎(RA)患者中有80%的阳性率。因此RF作为RA诊断的指标有重要价值。

[0003] 目前对RF的抗原表位研究仍然没有透彻,无法做成重组抗原,一般做法是将人IgG进行变性处理,变性的方法有化学变性和物理变性两种手段,化学变性会引入化学变性剂,需要增加纯化步骤,不利于放大生产;物理变性方法简单,但变性后的蛋白稳定性受到挑战,给应用端带来很多困扰,特别是应用于胶乳比浊产品时,容易发生非特异性凝集反应。

[0004] 目前一般的胶乳增强比浊法做法是先将IgG进行热变性,再偶联到胶乳上,但变性IgG本身不稳定,在变性过程中暴露出很多疏水基团,导致在变性过程中IgG发生自身凝集,变性后的聚合物不稳定,给应用带来很多问题,比如试剂不稳定,偶联胶乳容易凝集等。此外,直接加热变性容易导致IgG分子聚集,因此加热时间不能太长,但是加热时间不够,IgG分子又会没有得到充分的变性,导致得到的产品不仅稳定性不好,且活性也不高。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种变性IgG的制备方法,以缓解现有技术中变性过程中IgG发生自身凝集,变性后的聚合物不稳定的技术问题。

[0007] 本发明的第二目的在于提供上述制备方法制备得到的变性IgG。

[0008] 本发明的第三目的在于提供上述变性IgG在制备免疫抗原中的应用。

[0009] 本发明的第四目的在于提供一种类风湿因子免疫抗原的制备方法,以缓解现有技术中类风湿因子免疫抗原稳定性差,易凝集,抗原活性差的技术问题。

[0010] 本发明的第五目的在于提供上述制备方法制备得到的类风湿因子免疫抗原。

[0011] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0012] 一种变性IgG的制备方法,在蛋白保护剂存在的条件下将IgG变性,得到变性IgG。

[0013] 进一步地,所述蛋白保护剂包括二糖;

[0014] 优选地,所述二糖包括蔗糖、海藻糖、麦芽糖或乳糖;

[0015] 优选地,蛋白保护剂的最终用量为10-50w/v%,进一步优选为20-40w/v%。

[0016] 进一步地,将IgG变性的方法包括热变性、强酸强碱变性、盐酸胍变性或尿素变性,优选为热变性。

[0017] 进一步地,所述热变性包括:IgG在含有蛋白保护剂的缓冲液中加热变性,再降温

和避光。

[0018] 进一步地,所述IgG的含量为5-10mg/ml;

[0019] 优选地,所述缓冲液包括HEPES缓冲液、MES缓冲液或PBS缓冲液,进一步优选为PBS缓冲液,更进一步优选为pH7.3-7.5PBS缓冲液;

[0020] 优选地,所述加热变性的条件包括:在56-65℃条件下加热10-120min,优选为在60-63℃条件下加热30-90min;

[0021] 优选地,所述降温和避光包括:在0-8℃条件下避光至少2h。

[0022] 上述变性IgG的制备方法制备得到的变性IgG。

[0023] 上述变性IgG在制备免疫抗原中的应用。

[0024] 一种类风湿因子免疫抗原的制备方法,在蛋白保护剂存在的条件下,将抗原载体与上述变性IgG偶联,得到类风湿因子免疫抗原。

[0025] 进一步地,所述抗原载体包括胶乳、胶体金或磁珠;

[0026] 优选地,所述蛋白保护剂包括二糖;

[0027] 优选地,所述二糖包括蔗糖、海藻糖、麦芽糖或乳糖。

[0028] 上述类风湿因子免疫抗原的制备方法制备得到的类风湿因子免疫抗原。

[0029] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0030] 本发明提供一种变性IgG的制备方法,由于在变性过程中添加蛋白保护剂,避免变性过程中变性IgG形成聚集,提高了变性IgG的稳定性,使得IgG变性更加充分,暴露更多的抗原表位,提高抗原活性。该方法使得变性过程稳定,得到的变性IgG单分散性好,变性充分,活性高,保证了批间差,同时操作简单,成本低,方便大规模生产。

[0031] 本发明提供的类风湿因子免疫抗原的制备方法,是在蛋白保护剂的存在下,将抗原载体与本发明提供的变性IgG偶联得到类风湿因子免疫抗原。由于良好的改善了变性IgG的凝集问题,所以得到的类风湿因子免疫抗原稳定性更好,免疫抗原的活性得到显著提高,批间差变小,适合大规模生产。

附图说明

[0032] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0033] 图1为实施例1中不同浓度蔗糖对IgG变性的影响结果图;

[0034] 图2为实施例4中不同变性时间对变性IgG活性的影响结果图;

[0035] 图3为实施例5中不同变性温度对变性IgG活性的影响结果图;

[0036] 图4为实施例5中不同变性温度对变性IgG活性的影响结果图;

[0037] 图5为实施例6中不同变性缓冲液对变性IgG活性的影响结果图;

[0038] 图6为实施例7中不同浓度海藻糖对变性IgG的影响结果图。

具体实施方式

[0039] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会

理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。

[0040] 除非另有说明,本文中所用的专业与科学术语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法或材料也可应用于本发明中。

[0041] 一种变性IgG的制备方法,在蛋白保护剂存在的条件下将IgG变性,得到变性IgG。

[0042] 本发明提供的变性IgG的制备方法,由于在变性过程中添加蛋白保护剂,避免变性过程中变性IgG形成聚集,提高了变性IgG的稳定性,使得IgG变性更加充分,暴露更多的抗原表位,提高抗原活性。该方法使得变性过程稳定,得到的变性IgG单分散性好,变性充分,活性高,保证了批间差,同时操作简单,成本低,方便大规模生产。

[0043] 在优选地实施方式中,蛋白保护剂包括二糖,二糖例如可以为蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖等。本发明通过试验发现二糖的添加都可以起到良好的抗凝集效果,本发明中的二糖优选为蔗糖、海藻糖、麦芽糖或乳糖,进一步优选为蔗糖或海藻糖。

[0044] 在优选地实施方式中,蛋白保护剂的最终用量为10-50w/v%,进一步优选为20-40w/v%。可以理解的是,蛋白保护剂的最终用量中“w/v%”是指IgG变性反应中,mL单位变性反应体积中蛋白保护剂的mg质量含量。蛋白保护剂的用量过少,变性IgG的抗凝集效果差;蛋白保护剂的用量过多,变性IgG的抗原活性较差。蛋白保护剂的用量典型但非限制性的为10w/v%、20w/v%、30w/v%、40w/v%或50w/v%,将蛋白保护剂的用量优选为20-40w/v%,制备得到的变性IgG稳定性、抗原活性等性能更好。

[0045] 在优选地实施方式中,将IgG变性的方法包括热变性、强酸强碱变性、盐酸胍变性或尿素变性,优选为热变性。本发明中IgG变性的方法可以为现用的常规方法,包括但不限于热变性、强酸强碱变性、盐酸胍变性或尿素变性,但更优选为热变性的方式,热变性的方式无需纯化,简化了操作步骤。

[0046] 在优选地实施方式中,热变性包括: IgG在含有蛋白保护剂的缓冲液中加热变性,再降温和避光。

[0047] 在优选地实施方式中,IgG的含量为5-10mg/ml。其中,“mg/ml”表示每ml含有蛋白保护剂的缓冲液含有的mg IgG,IgG的含量典型但非限制性的为5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml或10mg/ml。

[0048] 在优选地实施方式中,缓冲液包括HEPES缓冲液、MES缓冲液或PBS缓冲液,进一步优选为PBS缓冲液,更进一步优选为pH7.3-7.5PBS缓冲液。本发明研究发现热变性用的缓冲液可以为HEPES缓冲液、MES缓冲液或PBS缓冲液,其中,pH7.4 PBS的效果最好。

[0049] 在优选地实施方式中,加热变性的条件包括:在56-65℃条件下加热10-120min,优选为在60-63℃条件下加热30-90min。加热温度过低,IgG不能发生变性;加热温度过高,IgG易发生蛋白凝集。加热时间过少,IgG变性不充分;加热时间过多,IgG易发生蛋白凝集。加热温度典型但非限制性的为56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃或65℃,加热时间典型但非限制性的为10min、30min、50min、70min、90min或120min。

[0050] 在优选地实施方式中,降温避光包括:在0-8℃条件下避光至少2h。

[0051] 本发明提供由上述制备方法制备得到的变性IgG。该变性IgG稳定性好,抗原表位暴露充分。

[0052] 本发明提供的变性IgG在制备免疫抗原中的应用。

[0053] 一种类风湿因子免疫抗原的制备方法,在蛋白保护剂存在的条件下,将抗原载体与本发明提供的变性IgG偶联,得到类风湿因子免疫抗原。由于本发明良好的改善了变性IgG的凝集问题,所以得到的类风湿因子免疫抗原稳定性更好,免疫抗原的活性得到显著提高,批间差变小,适合大规模生产。

[0054] 在优选地实施方式中,抗原载体包括胶乳、胶体金或磁珠。

[0055] 在优选地实施方式中,蛋白保护剂包括二糖,二糖例如可以为蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖等等。

[0056] 本发明最后提供上述制备方法制备得到的类风湿因子免疫抗原。

[0057] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0058] 实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0059] 胶乳(JSR公司制造);

[0060] 人IgG(购自卫武光明);

[0061] EDC:1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司);

[0062] NHS:N-羟基琥珀酰亚胺(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

[0063] 实施例1蔗糖浓度对变性效果的影响

[0064] 1.用10mmol/L PBS (PH7.4) 缓冲液分别配制含有0w/v%、10w/v%、20w/v%、30w/v%、40w/v%、50w/v%蔗糖溶液;

[0065] 2.分别用步骤1中的缓冲液将IgG (50mg/ml) 稀释成10mg/ml;

[0066] 3.将步骤2中的溶液,置于63℃恒温水浴箱中加热60min;

[0067] 4.将步骤3中加热后溶液,置于冰水浴中,避光处理2h;

[0068] 5.观察步骤4中的溶液,是否出现浑浊,结果见图1,从左到右蔗糖浓度依次为0w/v%、10w/v%、20w/v%、30w/v%、40w/v%、50w/v%。

[0069] 从图1的结果可知,蔗糖浓度小于30w/v%时,变性过程容易出现凝集。

[0070] 实施例2变性IgG偶联胶乳

[0071] 将实施例1中未出现浑浊溶液,进行胶乳偶联。

[0072] 偶联方案:

[0073] 1.取160 μ l粒径为188nm的10%聚苯乙烯羧胶乳,用10mmol/L的HEPES (PH7.5) 缓冲溶液定容至2ml;

[0074] 2.向步骤1缓慢加入50 μ l (10mg/ml) EDC溶液、50 μ l (10mg/ml) NHS溶液,室温搅拌反应20min后,用10mmol/L的HEPES (PH7.5) 缓冲溶液定容至10ml;

[0075] 3.分别取70 μ l实施例1中未出现浑浊的变性IgG溶液,加入尿素200mmol/L (终浓度),以及BSA 0.05% (终浓度) 进行稀释;

[0076] 4.将步骤3稀释后的变性IgG溶液,缓慢加入到步骤2中,室温搅拌反应3h;

[0077] 5.15000rpm离心40min,使用10mmol/L PBS (含0.2v/v%吐温20,0.1w/v%BSA,10w/v%蔗糖) 超声重悬,即为RF检测试剂2。

[0078] 实施例3不同蔗糖浓度对变性IgG活性的影响

[0079] 检测仪器:迈瑞BS480全自动生化分析仪;

[0080] 实验试剂:使用50mmol/L甘氨酸缓冲液作为RF检测试剂1,与实施例2中的RF检测试剂2组成成本实验检测试剂;

[0081] 校准品:使用RF病人标本血清进行稀释制备;

[0082] 检测参数:见表1

[0083] 检测结果:见表2,表中数据为检测的反应度值,由吸光度(absorbance)乘以10000得到。由表2可以看出,用含30w/v%蔗糖的10mmol/L PBS缓冲液稀释后加热的IgG,偶联后试剂,活性最高。

[0084] 表1

[0085]	样本量(μl)	2.5
	RF检测试剂1(μl)	200
	RF检测试剂2(μl)	50
	检测波长(nm)	660
	读点1	51-51
	读点2	65-65

[0086] 表2

	校准品浓度 (IU/ml)	30%蔗糖试剂	40%蔗糖试剂	50%蔗糖试剂
[0087]	0	47.8	1.5	-0.8
	11.5	655	51	178
	18.5	1066	295	404
	40	2101	950	1093
[0088]	85	4360	2926	3004
	150	7169	7189	7306

[0089] 实施例4变性时间对变性IgG活性的影响

[0090] 1.用含有30%蔗糖的10mmol/L PBS稀释人IgG,人IgG终浓度为10mg/ml,制成溶液1;

[0091] 2.将溶液1放置于63℃水浴中加热,分别设定加热时间为10、20、30、60、90、120min,制成溶液2;

[0092] 3.将溶液2用10mmol/L PBS(含有0.2v/v%吐温20,5w/v%蔗糖,0.1w/v%BSA)稀释成1mg/ml,制成RF检测试剂2;

[0093] 4.用10mmol/L PBS(含有0.5%吐温20,500mmol/L NaCl,5%PEG 6000)作为RF检测试剂1;

[0094] 5.检测仪器:迈瑞BS480全自动生化分析仪;

[0095] 6.检测参数:具体见表3;

[0096] 7.检测结果:具体见表4,表中数据为检测的反应度值,由吸光度(absorbance)乘以10000得到。由表4和图2可知,加热时间为60min反应趋势最佳。

[0097] 表3

[0098]	样本量 (μl)	15
	RF检测试剂1 (μl)	250
	RF检测试剂2 (μl)	50
	检测波长 (nm)	340
	读点1	49-49
	读点2	82-82

[0099] 表4

[0100]	RF 浓度 (IU/ml)	10min	20min	30min	60min	90min	120min
	0	44.4	42.3	48	48.3	130.4	292.6
	62.5	49.3	82.4	137.4	178.8	453.1	575.5
	125	87.9	188.3	265.4	340.8	667.6	803.6
[0101]	250	184.6	381	525.2	649.5	1070.6	1166.6
	500	350	682.2	923.2	1123.3	2203.2	1738.6
	1000	551.2	1070.2	1398.2	2093.1	3355	2544.7
	空白	67.7	45.9	46.9	51.1	117.3	62.5

[0102] 实施例5变性温度对变性IgG活性的影响

[0103] 1. 用10mmol/L PBS (PH7.4) 加入30w/v%的蔗糖;

[0104] 2. 用步骤1中的缓冲液将IgG (50mg/ml) 稀释成10mg/ml;

[0105] 3. 将步骤2中的溶液均等分成4份, 每份5ml, 分别置于56℃、60℃、63℃、65℃恒温水浴箱中加热60min;

[0106] 4. 将步骤3中加热后溶液, 置于冰水浴中, 避光处理2h;

[0107] 5. 将步骤4中的溶液用10mmol/L PBS (含有0.2v/v%吐温20, 5w/v%蔗糖, 0.1w/v%BSA) 稀释成1mg/ml, 制成RF检测试剂2;

[0108] 6. 用10mmol/L PBS (含有0.5%吐温20, 500mmol/L NaCl, 5%PEG 6000) 作为RF检测试剂1;

[0109] 7. 检测仪器: 迈瑞BS480全自动生化分析仪;

[0110] 8. 检测参数: 具体见表3;

[0111] 9. 检测结果: 具体见表5, 表中数据为检测的反应度值, 由吸光度 (absorbance) 乘以10000得到。由表5、图3和图4可知, 加热时间为60min反应趋势最佳。

[0112] 表5

[0113]	RF 浓度 (IIU/ml)	56℃	60℃	63℃	65℃
	0	49.8	116.0	63.3	56.6
	62.5	56.3	483.0	187.0	72.4
	125	56.1	729.0	339.0	140.5
	250	70.4	1118.3	633.2	262.5
	500	103.6	1787.0	1104.2	457.4

[0114]	1000	142.6	2653.8	1980.8	669.7
	空白	75.3	134.6	67.5	103.6

[0115] 实施例6变性缓冲液对变性IgG活性的影响

[0116] 1. 分别配置含有30w/v%蔗糖的PBS、PB、HEPES和MES溶液；

[0117] 2. 用步骤1中缓冲液稀释人IgG (50mg/ml) 至10mg/ml；

[0118] 3. 将步骤2中的溶液置于63℃水浴锅中，加热60min；

[0119] 4. 将步骤3中加热后的溶液置于冰水浴中，避光2小时；

[0120] 5. 将步骤4中的溶液用10mmol/L PBS (含有0.2v/v%吐温20, 5w/v%蔗糖, 0.1w/v%BSA) 稀释成1mg/ml, 制成RF检测试剂2；

[0121] 6. 用10mmol/L PBS (含有0.5%吐温20, 500mmol/L NaCl, 5%PEG6000) 作为RF检测试剂1；

[0122] 7. 检测仪器: 迈瑞BS480全自动生化分析仪；

[0123] 8. 检测参数: 具体见表3；

[0124] 9. 检测结果见表6和图5；由表6和图5可知, PBS缓冲液的反应活性和曲线趋势最佳；

[0125] 表6

RF 浓度 (IU/ml)	PBS	PB	HEPES	MES
0	63.3	65.1	51.7	50.0
62.5	187.0	187.0	53.9	52.0
125	339.0	337.5	52.9	46.0
250	633.2	604.6	48.0	47.1
500	1104.2	997.8	63.2	57.4
1000	1980.8	1470.2	98.6	53.4
空白	67.5	100.2	84.4	73.3

[0127] 实施例7蛋白保护剂对变性IgG的影响

[0128] 1. 用10mmol/L PBS (PH7.4) 缓冲液分别配制含有0w/v%、10w/v%、30w/v%海藻糖溶液；

[0129] 2. 分别用步骤1中的缓冲液将IgG (50mg/ml) 稀释成10mg/ml；

[0130] 3. 将步骤2中的溶液, 置于63℃恒温水浴箱中加热60min；

[0131] 4. 将步骤3中加热后溶液, 置于冰水浴中, 避光处理2h；

[0132] 5. 观察步骤4中的溶液, 是否出现浑浊, 结果见图3, 从左到右海藻糖浓度依次为0w/v%、10w/v%、30w/v%。

[0133] 从图6的结果可知, 海藻糖浓度小于30w/v%时, 变性过程容易出现凝集。

[0134] 实施例8批间差

[0135] 将实施例1中未出现浑浊条件, 即蔗糖浓度为30w/v%的条件进行工艺重复性验证, 对4个批次的变性原料进行胶乳偶联, 对比批间差；

[0136] 偶联方案：

[0137] 1.取160 μ l粒径为188nm的10%聚苯乙烯羧胶乳,用10mmol/L的HEPES (PH7.5) 缓冲溶液定容至2ml;

[0138] 2.向步骤1缓慢加入50 μ l (10mg/ml) EDC溶液、50 μ l (10mg/ml) NHS溶液,室温搅拌反应20min后,用10mmol/L的HEPES (PH7.5) 缓冲溶液定容至10ml;

[0139] 3.分别取70 μ l不同批次的变性IgG溶液,加入尿素200mmol/L (终浓度),以及BSA 0.05% (终浓度) 进行稀释;

[0140] 4.将步骤3稀释后的变性IgG溶液,缓慢加入到步骤2中,室温搅拌反应3h;

[0141] 5. 15000rpm离心40min,使用10mmol/L PBS (含0.2v/v%吐温20,0.1w/v%BSA, 10w/v%蔗糖) 超声重悬,即为RF检测试剂2。

[0142] 6.检测仪器:迈瑞BS480全自动生化分析仪;

[0143] 7.实验试剂:使用50mmol/L甘氨酸缓冲液作为RF检测试剂1;

[0144] 8.校准品:使用RF病人标本血清进行稀释制备;

[0145] 9.检测参数:见表1

[0146] 10.检测结果:见表7,由表7可以看出,重复生产4个批次的变性IgG,偶联胶乳后,测试反应度批间CV小于10%,批间重复性良好。

[0147] 表7

[0148]

批号	0	11.5	18.5	40	85	150	空白
20190104	55.1	600	1065	2161	4692	7155	5503
20190301	47.2	556	988	2142	4810	7509	5398
20190808	47.8	655	1066	2101	4360	7169	5605
20190919	52.8	598	958	2058	4583	7244	5536
均值	50.725	602.25	1019.25	2115.5	4611.25	7269.25	5510.5
SD	3.848268	40.59865	54.79279	45.78573	191.4391	164.5405	86.20325
CV	8%	7%	5%	2%	4%	2%	2%

[0149] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

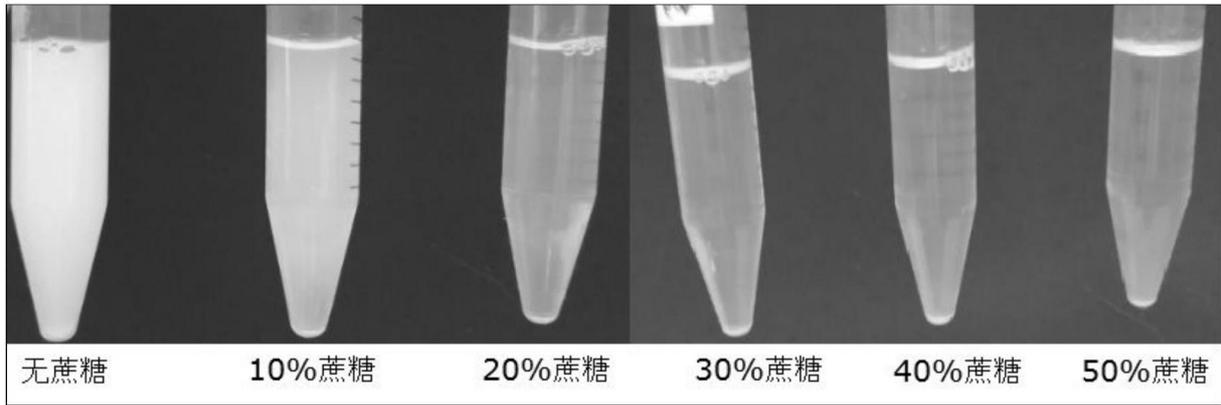


图1

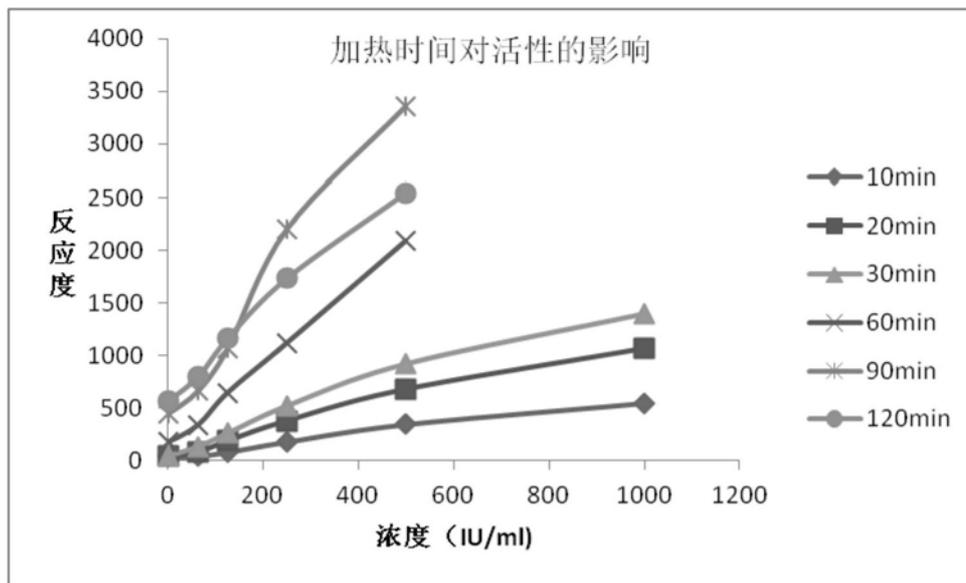


图2

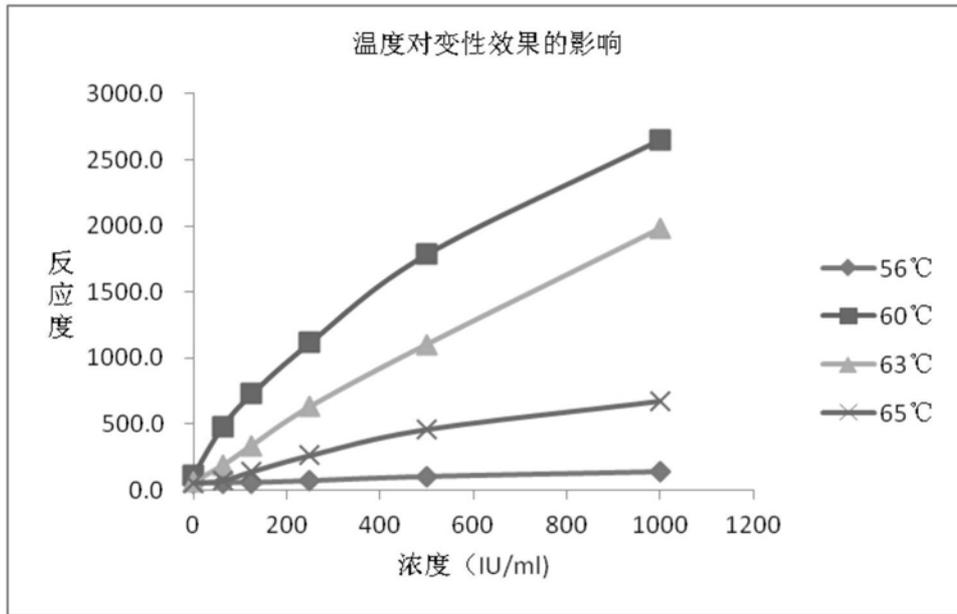


图3

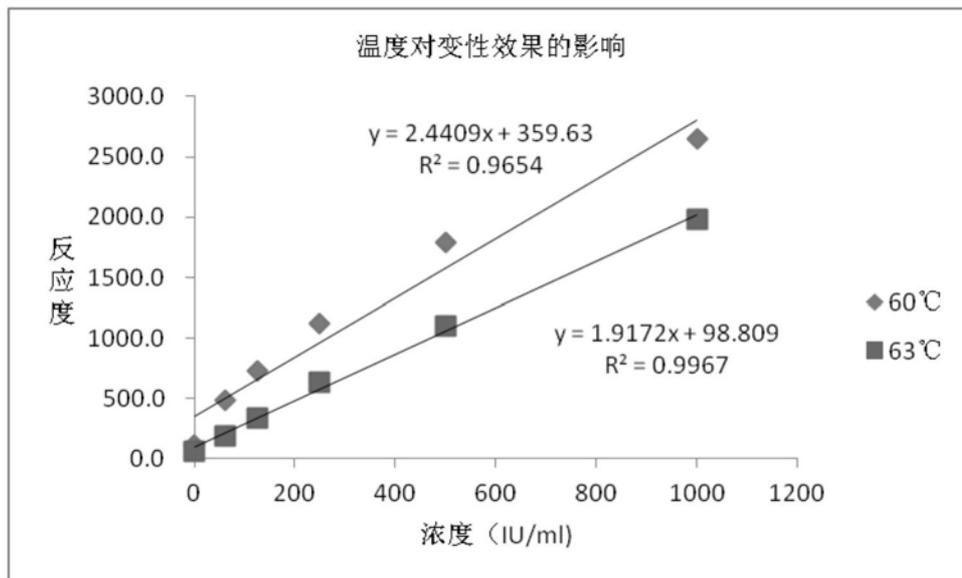


图4

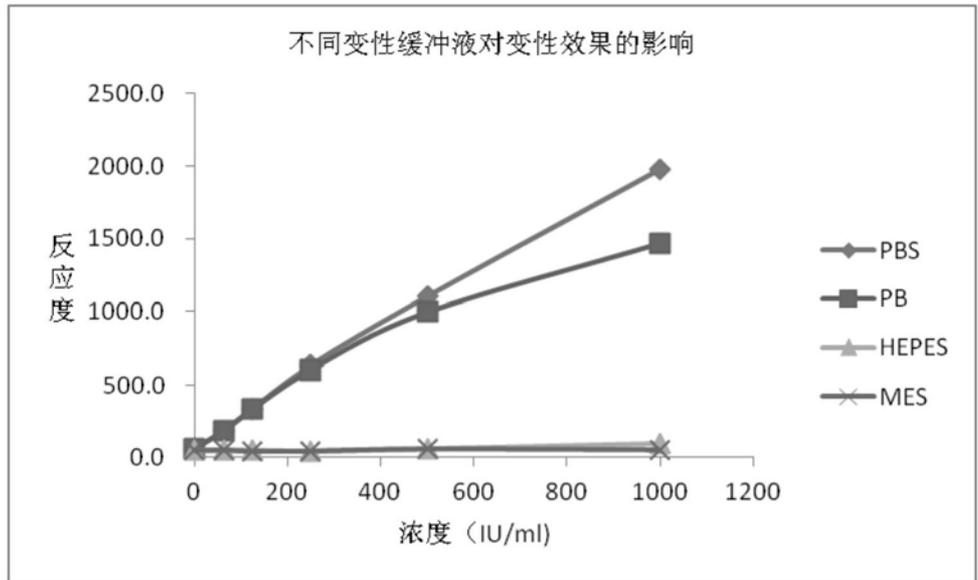


图5

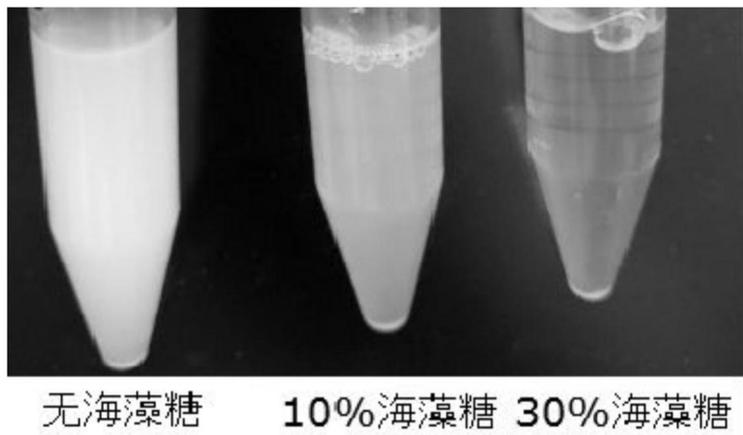


图6