



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112881675 A

(43)申请公布日 2021.06.01

(21)申请号 201911216732.3

(22)申请日 2019.11.29

(71)申请人 广东菲鹏生物有限公司

地址 523000 广东省东莞市松山湖高新技术产业开发区花莲路5号1号厂房7楼

(72)发明人 叶小琴 王文斌 夏良雨

(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)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

IgM抗体检测稀释液

(57)摘要

本发明涉及免疫诊断领域,具体而言,提供了一种IgM抗体检测稀释液。本发明提供的用于IgM抗体检测的待检测测试稀释液,包括稳定剂,其中,稳定剂包括甘露醇和/或尿素。发明人发现稳定剂在待检测测试稀释液中的添加,可以显著改善检测试剂假阳高,灵敏度低的问题。在IgM抗体检测试剂盒中添加本申请提供的待检测测试稀释液可以有效改善试剂盒的灵敏度和准确性,满足更多的需求,扩大应用范围。

1. 一种用于IgM抗体化学发光检测的待检测测试稀释液,其特征在于,包括稳定剂;所述稳定剂包括甘露醇和/或尿素。

2. 根据权利要求1所述的待检测测试稀释液,其特征在于,所述稳定剂包括甘露醇和尿素;

优选地,所述甘露醇的浓度为0.5-5w/v%,优选为1-5w/v%;

优选地,所述尿素的浓度为0.05-8mol/L,优选为0.5-4mol/L。

3. 根据权利要求1所述的待检测测试稀释液,其特征在于,所述待检测测试稀释液还包括缓冲液、氨基酸、金属盐离子、表面活性剂和螯合剂中的至少一种;

优选地,所述缓冲液包括HEPES缓冲液、Tris缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS缓冲液或MES缓冲液;

优选地,所述缓冲液的浓度为0.02-0.5mol/L,pH为7-8。

4. 根据权利要求3所述的待检测测试稀释液,其特征在于,所述氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸中的至少一种;

优选地,所述氨基酸为精氨酸;

优选地,所述氨基酸的浓度为10-200mmol/L,优选为20-100mmol/L。

5. 根据权利要求3所述的待检测测试稀释液,其特征在于,所述金属盐离子包括钾离子、钠离子或镁离子中的至少一种;

优选地,所述金属盐离子的浓度为0.05-1mol/L,优选为0.3-0.6mol/L。

6. 根据权利要求3所述的待检测测试稀释液,其特征在于,所述表面活性剂包括吐温20、CHAPS、吐温80、曲拉通X-100或十二烷基硫酸钠中的至少一种;

优选地,所述表面活性剂的浓度为0.05-5w/v%。

7. 根据权利要求3所述的待检测测试稀释液,其特征在于,所述螯合剂包括EDTA、NTA或DTPA;

优选地,所述螯合剂的浓度为1-30mmol/L。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的待检测测试稀释液,其特征在于,待检测样本包括血清或血浆。

9. 权利要求1-8任一项所述的待检测测试稀释液在制备IgM抗体化学发光检测试剂盒中的应用。

10. 一种IgM抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1-8任一项所述的待检测测试稀释液。

IgM抗体检测稀释液

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫诊断领域,具体而言,涉及一种IgM抗体检测稀释液。

背景技术

[0002] IgM是Immunoglobulin M的缩写,意思是免疫球蛋白M,根据结构的不同将免疫球蛋白分为五种,IgM是人的免疫球蛋白之一,其他还有IgA、IgG、IgD和IgE。IgM是胎儿合成的第一种Ig。IgM抗体占血清抗体总量的5%-10%,IgM抗体是抗体中分子量最大的一种,不能通过胎盘输给胎儿。IgG抗体是血清和细胞外液中主要的抗体成分,约占血清抗体总量的75%。IgG抗体是抗体中分子量最小的一种,可通过胎盘输给胎儿,保护婴儿最初六个月内免受感染。IgG抗体产生晚,维持时间长,消失慢,浓度高。血中检测到可作为远期感染指标。IgM抗体产生最早,一经感染,快速产生,在感染初期抗感染起作用,但维持时间短,消失快。当IgM消失,IgG才开始上升,血中检测到可作为近期感染指标。所以,通过检测血清中抗体的种类和含量可以诊断人体是否受到相关病毒感染,同时判断疾病感染所处阶段。

[0003] 目前,IgM抗体相关项目的免疫测试方法学中,普遍存在RF(类风湿因子)、异嗜抗体、补体等干扰,同时由于标记抗体、固相等的引入,易产生非特异性结合,从而产生假阳高、灵敏度低等问题。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于IgM抗体化学发光检测的待检测测试稀释液及应用其的IgM抗体化学发光检测试剂盒,以缓解现有技术中IgM抗体相关项目化学发光免疫检测中假阳情况较多并且灵敏度较差的问题。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0007] 一种用于IgM抗体化学发光检测的待检测测试稀释液,包括稳定剂;所述稳定剂包括甘露醇和/或尿素。

[0008] 进一步地,所述稳定剂包括甘露醇和尿素;

[0009] 优选地,所述甘露醇的浓度为0.5-5w/v%,优选为1-5w/v%;

[0010] 优选地,所述尿素的浓度为0.05-8mol/L,优选为0.5-4mol/L。

[0011] 进一步地,所述待检测测试稀释液还包括缓冲液、氨基酸、金属盐离子、表面活性剂和螯合剂中的至少一种;

[0012] 优选地,所述缓冲液包括HEPES缓冲液、Tris缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS缓冲液或MES缓冲液;

[0013] 优选地,所述缓冲液的浓度为0.02-0.5mol/L,pH为7-8。

[0014] 进一步地,所述氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸中的至少一种;

[0015] 优选地,所述氨基酸为精氨酸;

- [0016] 优选地,所述氨基酸的浓度为10-200mmol/L,优选为20-100mmol/L。
- [0017] 进一步地,所述金属盐离子包括钾离子、钠离子或镁离子中的至少一种;
- [0018] 优选地,所述金属盐离子的浓度为0.05-1mol/L,优选为0.3-0.6mol/L。
- [0019] 进一步地,所述表面活性剂包括吐温20、CHAPS、吐温80、曲拉通X-100或十二烷基硫酸钠中的至少一种;
- [0020] 优选地,所述表面活性剂的浓度为0.05-5w/v%。
- [0021] 进一步地,所述螯合剂包括EDTA、NTA或DTPA;
- [0022] 优选地,所述螯合剂的浓度为1-30mmol/L。
- [0023] 进一步地,待检测样本包括血清或血浆。
- [0024] 上述待检测测试稀释液在制备IgM抗体化学发光检测试剂盒中的应用。
- [0025] 一种IgM抗体化学发光检测试剂盒,所述试剂盒包括上述的待检测测试稀释液。
- [0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:
- [0027] 本发明提供的用于IgM抗体检测的待检测测试稀释液,包括稳定剂,稳定剂包括甘露醇和/或尿素。发明人针对现有技术中对于各种IgM抗体进行检测的手段普遍存在假阳率高和灵敏度较差的问题进行研发,发现稳定剂在待检测测试稀释液中的添加,可以显著改善检测试剂假阳高的问题,甘露醇和/或尿素作为稳定剂,在假阳改善的基础上,保证了灵敏度的提高,配合其他组分使得IgM抗体检测结果更加准确和灵敏,该待检测测试稀释液能够有效地规避抗原非特异性吸附、补体等干扰问题,提高检测的灵敏度和准确性。所以,在IgM抗体检测试剂盒中添加本申请提供的待检测测试稀释液可以有效改善试剂盒的灵敏度和准确性,满足更多的需求,扩大应用范围。

具体实施方式

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 一种用于IgM抗体化学发光检测的待检测测试稀释液,包括稳定剂,稳定剂包括甘露醇和/或尿素。

[0031] 发明人针对现有技术中对于各种IgM抗体进行检测的手段普遍存在假阳率高和灵敏度较差的问题进行研发,发现稳定剂在待检测测试稀释液中的添加,可以显著改善检测试剂假阳高的问题,甘露醇和/或尿素作为稳定剂,在假阳改善的基础上,保证了灵敏度的提高,配合其它组分使得IgM抗体检测结果更加准确和灵敏,该待检测测试稀释液能够有效地规避抗原非特异性吸附、补体等干扰问题,提高检测的灵敏度和准确性。需要说明的是,本发明提供的待检测测试稀释液适用的IgM抗体化学发光检测项目包括各种病毒、支原体、寄生虫等等的IgM抗体,例如巨细胞和HSV等等,通用性较好,优选为人巨细胞病毒或弓形虫等。

[0032] 在优选地实施方式中,稳定剂包括甘露醇和尿素。甘露醇和尿素的共同使用可以有效降低抗原非特异性吸附、补体等干扰项的干扰,有效提高检测准确性和灵敏度。

[0033] 需要说明的是,本发明中“w/v%”是指每1L稀释液含有的物质质量g。

[0034] 在优选地实施方式中,甘露醇的浓度为0.5-5w/v%,优选为1-5w/v%。

[0035] 在优选地实施方式中,尿素的浓度为0.05-8mol/L,优选为0.5-4mol/L。

[0036] 发明人对甘露醇和尿素的浓度进行优化,得到上述效果较好的组分浓度。其中,甘露醇的浓度是指每1L稀释液中含有甘露醇0.5-5g,甘露醇的浓度典型但非限制性的为0.5w/v%、1w/v%、1.5w/v%、2w/v%、2.5w/v%、3w/v%、3.5w/v%、4w/v%、4.5w/v%或5w/v%;尿素的浓度典型但非限制性的为0.05mol/L、0.5mol/L、1mol/L、2mol/L、3mol/L、4mol/L、5mol/L、6mol/L、7mol/L或8mol/L。

[0037] 在优选地实施方式中,待检测测试稀释液还包括缓冲液、氨基酸、金属盐离子、表面活性剂和螯合剂中的至少一种。优选为含有缓冲液、氨基酸、金属盐离子、表面活性剂和螯合剂。上述组分氨基酸、表面活性剂、金属盐离子和螯合剂的添加也有助于IgM抗体化学发光检测性能的改善。

[0038] 在优选地实施方式中,缓冲液包括HEPES缓冲液、Tris缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS缓冲液或MES缓冲液,缓冲液的浓度优选为0.02-0.5mol/L,pH为7-8。缓冲液的浓度典型但非限制性的为0.02mol/L、0.1mol/L、0.2mol/L、0.3mol/L、0.4mol/L或0.5mol/L;pH值典型但非限制性的为7、7.2、7.4、7.6、7.8或8。缓冲液进一步优选为0.05mol/L,PH 7.5的HEPES缓冲液,经试验证实该缓冲液组分的稀释液效果较优。

[0039] 在优选地实施方式中,氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸或蛋氨酸中的至少一种,优选为精氨酸。氨基酸的浓度优选为10-200mmol/L,进一步地优选为20-100mmol/L。氨基酸的浓度典型但非限制性的为10mmol/L、50mmol/L、100mmol/L、150mmol/L或200mmol/L。氨基酸进一步优选为25mmol/L的精氨酸,该配比的氨基酸经验证效果较优。

[0040] 在优选地实施方式中,金属盐离子包括钾离子、钠离子或镁离子中的至少一种。钾离子的来源可以是氯化钾、硫酸钾等;钠离子的来源可以是氯化钠、硫酸钠等;镁离子的来源可以是氯化镁、硫酸镁等。盐离子的浓度优选为0.05-1mol/L,进一步优选为0.3-0.6mol/L。金属盐离子的浓度典型但非限制性的为0.05mol/L、0.1mol/L、0.2mol/L、0.3mol/L、0.4mol/L、0.5mol/L、0.6mol/L、0.7mol/L、0.8mol/L、0.9mol/L或1mol/L。本发明中,金属盐离子优选为0.5mol/L的钾离子,进一步优选为0.5mol/L氯化钾,发明人经研究证实该金属盐离子的效果较优。

[0041] 在优选地实施方式中,表面活性剂包括吐温20、CHAPS (3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲氨基]-1-丙磺酸)、吐温80、曲拉通X-100或十二烷基硫酸钠中的至少一种,表面活性剂的浓度为0.05-5w/v%。本发明中表面活性剂可以为吐温20、曲拉通X-100、CHAPS和吐温80、吐温80和曲拉通X-100和十二烷基硫酸钠等等,优选为吐温20和CHAPS。表面活性剂的浓度是指每1L稀释液中含有0.05-5g,典型但非限制性的为0.05w/v%、0.5w/v%、1w/v%、1.5w/v%、2w/v%、2.5w/v%、3w/v%、3.5w/v%、4w/v%、4.5w/v%或5w/v%。本发明中进一步表面活性剂为0.1w/v%吐温20和1w/v%CHAPS。

[0042] 在优选地实施方式中,螯合剂包括EDTA(乙二胺四乙酸)、NTA(氨基三乙酸)或DTPA(二乙烯三胺五乙酸),螯合剂的浓度优选为1-30mmol/L。螯合剂的浓度典型但非限制性的为1mmol/L、10mmol/L、20mmol/L或30mmol/L。螯合剂优选为10mmol/L的EDTA。

[0043] 在优选地实施方式中,待检测样本包括血清或血浆。

[0044] 本发明提供上述待检测测试稀释液在制备IgM抗体化学发光检测试剂盒中的应用。

[0045] 一种含有上述待检测测试稀释液的IgM抗体化学发光检测试剂盒。

[0046] 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。

[0047] 实施例1

[0048] 一种用于IgM抗体化学发光检测的待检测测试稀释液,包括如下组分:0.05mol/L pH7.5 HEPES缓冲液,25mmol/L精氨酸,500mmol/L KCl,0.1w/v%吐温20、1w/v%CHAPS、2w/v%甘露醇、1mol/L尿素和10mmol/L EDTA。

[0049] 实施例2

[0050] 本实施例涉及一种巨细胞IgM抗体的检测方法。

[0051] 1. 试剂盒的制备。

[0052] 本发明的巨细胞IgM抗体化学发光免疫分析测定试剂盒:包括以下步骤:

[0053] 1) 鼠抗人IgM抗体的制备:

[0054] 鼠抗人IgM抗体是由天然提取的人IgM抗体免疫小鼠,获得能够专一合成抗人IgM抗体的B淋巴细胞;然后应用细胞杂交技术,将骨髓瘤细胞与上述的B淋巴细胞合二为一,得到杂交的骨髓瘤细胞,实施体外培养,在培养过程中,杂交瘤细胞产生并分泌抗人IgM单克隆抗体,收集培养上清液,经过纯化得到所需的鼠抗人IgM单克隆抗体。

[0055] 2) 磁珠体系:磁珠为 γ Fe₂O₃或Fe₃O₄磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,并具有0.1-5 μ m的粒径,其表面带有羧基功能基团,将其依此使用EDC (Thermo交联剂,货号22981)及NHS (thermo交联剂,货号24500)进行活化从而引入NHS酯官能团。进一步的,采用以下方法制备:

[0056] a) 将鼠抗人IgM抗体用1 \times PBS进行透析;

[0057] b) 将透析后鼠抗人IgM抗体,以10-70 μ g/mg磁珠的比例与磁珠进行混合,2-8 $^{\circ}$ C反应18小时;

[0058] c) 将反应物用磁分离器分离,用磁珠试剂缓冲液将磁珠稀释后作为工作液使用。

[0059] 3) 酶标记物体系:

[0060] 在其中一个实施例中,酶示踪物选自碱性磷酸酶,进一步可采用以下方法制备:

[0061] a) 将碱性磷酸酶用10mM HEPES进行透析,然后用SMCC (thermo交联剂,货号22122)进行活化;

[0062] b) 将巨细胞抗原用10mM PBS进行透析,用2IT (thermo交联剂,货号26101)活化;

[0063] c) 将活化后的碱性磷酸酶与巨细胞抗原纯化,除杂,然后再进行混合,2-8 $^{\circ}$ C反应6-24小时。

[0064] d) 将反应物用层析柱纯化,用酶标试剂缓冲液将酶标抗原稀释后作为工作液使用。鼠抗人IgM抗体2和碱性磷酸酶的物质量为1:1-1:5;2-IT与鼠抗人IgM的摩尔比为1:1-1:100,SMCC与碱性磷酸酶的摩尔比为1:1-1:50。

[0065] 4) 发光底物制备:人工合成金刚烷胺类发光底物及其增强剂,均经无菌过滤,制备发光底物工作液。

[0066] 5) 洗涤液制备:洗涤液为含有Tween-20的PBS,其中Tween-20的工作浓度为0.01-

0.1%，优选0.03-0.05%。

[0067] 6) 质控品：

[0068] 巨细胞IgM抗体阴性质控：由巨细胞IgM的特异性抗体阴性血清配制而成；

[0069] 巨细胞IgM抗体阳性质控：由巨细胞IgM的特异性抗体阳性血清配制而成。

[0070] 7) 制备巨细胞IgM抗体高通量检测试剂盒：

[0071] 包被鼠抗人IgM抗体的磁珠、碱性磷酸酶标记巨细胞抗原、样本稀释液、测试稀释液、发光底物、洗涤液、巨细胞IgM抗体阴性质控品、巨细胞IgM抗体阳性质控品和外包装盒共同组成的巨细胞IgM抗体化学发光检测试剂盒。

[0072] 2. 巨细胞IgM抗体的检测方法，采用上述的试剂盒，包括以下步骤：

[0073] 1) 取待测样本10 μ L，加入90 μ L样本稀释液，取稀释好的样本10 μ L，加入包被有鼠抗人IgM抗体的磁珠工作液50 μ L和50 μ L测试稀释液中，37 $^{\circ}$ C孵育15min；

[0074] 2) 加入磁场进行磁分离1min，去上清；

[0075] 3) 洗涤4次，每次250 μ L洗液，重复步骤2操作；

[0076] 4) 加入偶联了巨细胞抗原的碱性磷酸酶的工作液100 μ L，37 $^{\circ}$ C孵育15min；

[0077] 5) 加入磁场进行磁分离1min，去上清；

[0078] 6) 洗涤4次，每次250 μ L洗液，重复步骤4操作；

[0079] 7) 加入底物100 μ L，必须于加化学发光底物液后的第5-30分钟内测量各孔的发光强度(RLU)，测量时间1秒/孔。

[0080] 8) 均值各孔的RLU值与CUTOFF比较，样品测定值S/C0=发光值/cutoff值，则大于1，则判断为阳性，否则为阴性；cutoff值的确认：暂定C1是cutoff值。

[0081] 实施例3

[0082] 用实施例2中的巨细胞IgM抗体检测试剂实施检测，以不添加测试稀释液为对照组，以50mM HEPES+0.5M KCl作测试稀释液为实验组条件1；以含有50mM HEPES加入0.5MKCl和2w/v%甘露醇的缓冲作测试稀释液实验组条件2；以含有50mM HEPES加入0.5M KCl、2w/v%甘露醇和0.025M精氨酸的缓冲作测试稀释液实验组条件3；以含有50mM HEPES加入0.5MKCl、2w/v%甘露醇、0.025M精氨酸和1M尿素的缓冲作测试稀释液实验组条件4；以添加实施例1中的测试稀释液作为实验组条件5，同时设置阴性质控C0、弱阳质控C1和阳性质控C2，对4个临床阴性血清样本(阴性样本1-4)进行检测，结果如下表所示：

[0083]

样本编号	对照-不加测试稀释液结果			条件 1-0.5M KCl			条件 2-0.5M KCl+2%甘露醇		
	发光值 1	发光值 2	均值 1	发光值 1	发光值 2	均值 1	发光值 1	发光值 2	均值 1
C1	38377	40229	39303	36566	37804	37185	46991	49684	48338
C2	316359	334892	325626	329388	324345	326867	449883	444834	447359
C0	2754	2763	19295	1695	1853	3755	1900	1753	4116
阴性样本 1	72722	74753		10572	10642		11338	12353	
阴性样本 2	3419	3485		1084	1088		1163	1193	
阴性样本 3	6715	6798		2269	2306		2505	2519	
阴性样本 4	9650	9886		2902	3135		3216	3222	
	条件 3-0.5MKCl+2%甘露醇+0.025M 精氨酸			条件 4-0.5MKCl+2%甘露醇+0.025M 精氨酸+1M 尿			条件 5-实施例 1		

样本编号	素			素			素		
	发光值 1	发光值 2	均值 1	发光值 1	发光值 2	均值 1	发光值 1	发光值 2	均值 1
C1	42586	43523	43055	36647	35908	36278	37568	37606	37587
C2	402969	420227	411598	309547	315618	312583	320796	316004	318400
C0	1396	1458	2850	1068	1150	1392	990	1003	1102
阴性样本 1	7889	8203		2682	2785		1825	1841	
阴性样本 2	809	836		663	713		667	709	
阴性样本 3	1745	1761		927	943		838	882	
阴性样本 4	2260	2142		1532	1452		1091	1177	

[0085] 比较对照组和五个条件的信号值偏差和信噪比P/N(阳性信号与阴性信号的比值)：

		对照	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
信号偏差	C1	/	-5.4%	23.0%	9.5%	-7.7%	-4.4%
	C2		0.4%	37.4%	26.4%	-4.0%	-2.2%
	阴性本底		-80.5%	-78.7%	-85.2%	-92.8%	-94.3%
P/N	C1	14.25	20.96	26.46	30.17	32.71	37.72
	C2	118.04	184.25	244.93	288.44	281.86	319.52

[0087] 结果显示,条件1、条件3至条件5有降低背景,降低信号的作用,其中,条件3-5的稀释液显著降低了阴性样本值,增加检测灵敏度并降低了背景,有效改善了假阳性检出率高的问题。条件2有效提高了阳性信号,增加了检测灵敏度。

[0088] 实施例4

[0089] 用实施例2中的CMV gM抗体检测试剂实施检测,以添加实施例1中的待检测测试稀释液作为实验组,不添加为对照组,同时设置阴性质控C0、弱阳质控C1和阳性质控C2,对15个临床阴性血清样本(阴性样本1-15)进行检测,10例阴性血浆样本(阴性样本16-25),结果如下表所示:

[0090] 1、质控品检测(灵敏度比较)：

样本编号	对照组-不加实施例1的结果				验证组-添加实施例1的结果			
	发光值 1	发光值 2	均值 1	P/N	发光值 1	发光值 2	均值 1	P/N
阴性质控 C0	2364	2701	2532	/	1213	1062	1137	/
弱阳质控 C1	36171	36988	36580	14.4	25469	28227	26848	23.61
阳性质控 C2	278820	294739	286780	113.3	196166	215707	205937	181.12

[0092] 从上述表中可以看出,不添加本发明提供的待检测测试稀释液(对照组)检测质控品,信噪比P/N明显低于验证组(添加测试稀释液),检测灵敏度得到显著改善。

[0093] 2、阴性样本的检测(比较背景差异和假阳概率)：

样本编号	不加实施例 1 的结果				添加实施例 1 的结果			
	发光值 1	发光值 2	均值 1	S/CO	发光值 1	发光值 2	均值 1	S/CO
阴性样本 1	4529	4876	4703	0.13	1330	1353	1342	0.05
阴性样本 2	4544	5001	4773	0.13	2301	2379	2340	0.09
阴性样本 3	7285	7614	7450	0.20	1730	1744	1737	0.06
阴性样本 4	2703	2723	2713	0.07	2691	2748	2720	0.10
阴性样本 5	4825	5335	5080	0.14	2250	2376	2313	0.09
阴性样本 6	7940	8699	8320	0.23	1596	1586	1591	0.06
阴性样本 7	2706	2822	2764	0.08	2607	2698	2653	0.10
阴性样本 8	4404	4601	4503	0.12	1445	1431	1438	0.05
阴性样本 9	7824	8406	8115	0.22	2347	2463	2405	0.09
阴性样本 10	2818	2956	2887	0.08	1747	1779	1763	0.07
阴性样本 11	2296	2508	2402	0.07	2931	3028	2980	0.11
阴性样本 12	2273	2431	2352	0.06	1419	1486	1453	0.05
阴性样本 13	8621	9332	8977	0.25	2500	2489	2495	0.09
阴性样本 14	2286	2305	2296	0.06	1908	1864	1886	0.07
阴性样本 15	56698	62119	59409	1.62	2823	2956	2890	0.11
阴性样本 16	2747	2997	2872	0.08	1389	1368	1379	0.05
阴性样本 17	4454	4780	4617	0.13	2718	2860	2789	0.10
阴性样本 18	7455	7848	7652	0.21	1861	1874	1868	0.07
阴性样本 19	2613	2760	2687	0.07	3091	3063	3077	0.11
阴性样本 20	2391	2464	2428	0.07	2543	2636	2590	0.10
阴性样本 21	2190	2378	2284	0.06	1793	1752	1773	0.07
阴性样本 22	9184	9187	9186	0.25	3275	3197	3236	0.12
阴性样本 23	2223	2322	2273	0.06	1548	1506	1527	0.06
阴性样本 24	59332	65570	62451	1.71	2571	2473	2522	0.09
阴性样本 25	4560	4852	4706	0.13	1893	1995	1944	0.07

[0094]

[0095] 从上述表中可以看出,不添加本发明提供的待检测测试稀释液的阴性样本15和24都被检测为假阳性结果,而添加本发明提供的待检测测试稀释液的阴性样本全部为阴性结果,明显改善阴性样本信号值乱跳和背景高问题,并且假阳消除,检测准确性得到显著改善。

[0096] 实施例5

[0097] 本实施例涉及一种HSV-1IgM抗体的检测方法。

[0098] 1. 试剂盒的制备。

[0099] 涉及案例的HSV-1IgM(单纯疱疹病毒1型IgM抗体)抗体化学发光免疫分析测定试剂盒:包括以下步骤:

[0100] 1) 磁微粒包被鼠抗人IgM抗体的制备:同实施例2。

[0101] 2) 酶标记物体系:

[0102] 在其中一个实施例中,酶示踪物选自碱性磷酸酶,进一步可采用以下方法制备:

[0103] a) 将碱性磷酸酶用10mM HEPES进行透析,然后用SMCC(thermo交联剂,货号22122)进行活化;

[0104] b) 将HSV-1抗原用10mM PBS进行透析,用2IT(thermo交联剂,货号26101)活化;

[0105] c) 将活化后的碱性磷酸酶与HSV-1抗原纯化,除杂,然后再进行混合,2-8℃反应6-24小时。

[0106] d) 将反应物用层析柱纯化,用酶标试剂缓冲液将酶标抗原稀释后作为工作液使用。鼠抗人IgM抗体2和碱性磷酸酶的物质的量比为1:1-1:5;2-IT与鼠抗人IgM的摩尔比为1:1-1:100,SMCC与碱性磷酸酶的摩尔比为1:1-1:50。

[0107] 3) 发光底物制备:人工合成金刚烷胺类发光底物及其增强剂,均经无菌过滤,制备发光底物工作液。

[0108] 4) 洗涤液制备:洗涤液为含有Tween-20的PBS,其中Tween-20的工作浓度为0.01-0.1%,优选0.03-0.05%。

[0109] 5) 质控品:

[0110] HSV-1IgM抗体阴性质控:由HSV-1IgM的特异性抗体阴性血清配制而成;

[0111] HSV-1IgM抗体阳性质控:由HSV-1IgM的特异性抗体阳性血清配制而成。

[0112] 6) 制备HSV-1IgM抗体高通量检测试剂盒

[0113] 包被鼠抗人IgM抗体的磁珠、碱性磷酸酶标记巨细胞抗原、样本稀释液、测试稀释液、发光底物、洗涤液、HSV-1IgM抗体阴性质控品、HSV-1IgM抗体阳性质控品和外包装盒共同组成的HSV-1IgM抗体化学发光检测试剂盒。

[0114] 2. HSV-1IgM抗体的检测方法,采用上述的试剂盒,包括以下步骤:

[0115] 1) 取待测样本10uL,加入90uL样本稀释液,取稀释好的样本10uL,加入包被有鼠抗人IgM抗体的磁珠工作液50uL和50uL测试稀释液中,37℃孵育15min;

[0116] 2) 加入磁场进行磁分离1min,去上清;

[0117] 3) 洗涤4次,每次250uL洗液,重复步骤2操作;

[0118] 4) 加入偶联了HSV-1抗原的碱性磷酸酶的工作液100uL,37℃孵育15min;

[0119] 5) 加入磁场进行磁分离1min,去上清;

[0120] 6) 洗涤4次,每次250uL洗液,重复步骤4操作;

[0121] 7) 加入底物100uL,必须于加化学发光底物液后的第5-30分钟内测量各孔的发光强度(RLU),测量时间1秒/孔。

[0122] 8) 均值各孔的RLU值与CUTOFF比较,样品测定值S/C0=发光值/cutoff值,则大于1,则判断为阳性,否则为阴性;cutoff值的确认:暂定C1是cutoff值。

[0123] 用上述的HSV-1IgM抗体检测试剂实施检测,以添加实施例1中的待检测测试稀释液作为实验组,不添加为对照组,同时设置阴性质控C0、弱阳质控C1和阳性质控C2,对15个临床阴性血清样本(阴性样本1-15)和15例阴性血浆样本(阴性样本16-30)进行检测,结果如下表所示:

[0124]

	对照组-不加实施例1的结果	验证组-添加实施例1的结果
--	---------------	---------------

质控品编号		发光值 1	发光值 2	均值 1	P/N	发光值 1	发光值 2	均值 1	P/N
阴性质控 C0		1556	1695	1626	/	711	713	712	/
弱阳质控 C1		20087	20585	20336	12.51	20173	21169	20671	29.03
阳性质控 C2		138489	145825	142157	87.45	155518	159327	157423	221.10
样本编号		发光值 1	发光值 2	均值 1	S/CO	发光值 1	发光值 2	均值 1	S/CO
假阳 风险 样本	阴性样本 6	23047	24683	23865	1.17	3231	3352	3291.5	0.16
	阴性样本 28	12810	13744	13277	0.65	2765	2645	2705	0.13
	阴性样本 23	12677	13448	13063	0.64	4333	4564	4449	0.22
	阴性样本 20	11879	12109	11994	0.59	7202	7317	7260	0.35
	阴性样本 12	3968	4280	4124	0.20	2119	2157	2138	0.10
阴性样本 1		864	880	872	0.04	591	573	582	0.03
阴性样本 2		855	869	862	0.04	532	542	537	0.03
阴性样本 3		829	829	829	0.04	621	637	629	0.03
阴性样本 4		899	926	913	0.04	567	548	557.5	0.03
[0125]	阴性样本 5	861	904	883	0.04	627	662	644.5	0.03
阴性样本 7		1171	1233	1202	0.06	795	823	809	0.04
阴性样本 8		1174	1230	1202	0.06	697	683	690	0.03
阴性样本 9		1162	1196	1179	0.06	739	767	753	0.04
阴性样本 10		1158	1159	1159	0.06	773	780	776.5	0.04
阴性样本 11		2846	2882	2864	0.14	1774	1858	1816	0.09
阴性样本 13		1317	1429	1373	0.07	856	834	845	0.04
阴性样本 14		1261	1302	1282	0.06	772	785	778.5	0.04
阴性样本 15		1281	1375	1328	0.07	794	758	776	0.04
阴性样本 16		1109	1210	1160	0.06	814	782	798	0.04
阴性样本 17		1428	1433	1431	0.07	926	975	950.5	0.05
阴性样本 18		1385	1491	1438	0.07	832	805	818.5	0.04
阴性样本 19		1378	1416	1397	0.07	957	998	977.5	0.05
阴性样本 21		1337	1426	1382	0.07	811	780	795.5	0.04
阴性样本 22		1164	1263	1214	0.06	874	835	854.5	0.04
阴性样本 24		1422	1499	1461	0.07	904	915	909.5	0.04
阴性样本 25		1542	1625	1584	0.08	1038	1076	1057	0.05
阴性样本 26		1414	1506	1460	0.07	884	912	898	0.04
[0126]	阴性样本 27	1535	1597	1566	0.08	988	954	971	0.05
阴性样本 29		1533	1635	1584	0.08	951	925	938	0.05
阴性样本 30		1407	1525	1466	0.07	917	949	933	0.05

[0127] 从上述表中可以看出,不添加本发明提供的待检测测试稀释液(对照组)的质控品检测信噪比(P/N)明显低于添加本发明提供的待检测测试稀释液(验证组),验证组的检测

灵敏度得到显著改善；

[0128] 不添加本发明提供的待检测测试稀释液的阴性样本6被检测为假阳性结果，阴性样本28、阴性样本23、阴性样本20、阴性样本12检测发光值偏高，有假阳风险；而添加本发明提供的待检测测试稀释液的阴性样本全为阴性结果，明显改善阴性样本信号值乱跳和背景高问题，并且假阳消除，检测准确性得到显著改善。

[0129] 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。