

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810105417.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 11 月 4 日

[11] 公开号 CN 101571544A

[22] 申请日 2008.4.29

[21] 申请号 200810105417.9

[71] 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中
路 7 号北科技园

[72] 发明人 高 将 应希堂 宋胜利 胡国茂
唐宝军 于尚永

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明属于临床血液免疫检测技术领域，涉及一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒的组分主要有：阴性和阳性对照品；样品稀释液；胰岛细胞抗原包被的固相载体；羊抗人 IgG 抗体酶标记物；化学发光底物和浓缩洗涤液。制备上述各组分并组装即为成品试剂盒。本发明的试剂盒用于检测血清中的胰岛细胞抗体，对 I 型糖尿病的早期诊断具有重要意义。

1、一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒，其特征在于，所述试剂盒的组分主要有：胰岛细胞抗体阴性和阳性对照品；样品稀释液；胰岛细胞抗原包被的固相载体；羊抗人 IgG 抗体酶标记物；化学发光底物；以及浓缩洗涤液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述样品稀释液为灭活的小牛血清。

5、一种制备权利要求 1 所述试剂盒的方法，其特征在于包括以下步骤：

1) 配制胰岛细胞抗体阴性和阳性对照品；2) 配制样品稀释液；3) 以胰岛细胞抗原包被固相载体；4) 以酶标记羊抗人 IgG 抗体；5) 配制化学发光底物；6) 配制浓缩洗涤液；7) 分装上述阴性和阳性对照品、样品稀释液、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液；8) 组装为成品。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述胰岛细胞抗原包被微孔板、塑料珠和塑料管的步骤 3) 采用以下方法：用 0.050M pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成所需浓度的包被液，并将其负载于固相载体上，然后进行洗涤，BSA 封闭，除湿干燥并用铝箔袋封装。

7、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述胰岛细胞抗原联结磁性颗粒的步骤 3) 采用以下方法：将磁颗粒用戊二醛进行活化，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗并用该溶液进行悬浮；在悬浮液中加入适量的胰岛细胞抗原，4℃下搅拌过夜后，然后用含有 0.2%~1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、0.02mol/L 的磷酸缓冲液封闭；最后用 pH 值为 7.4、含吐温-20 和叠氮化钠防腐剂的磷酸盐洗涤缓冲液清洗，并用该溶液配制成所需浓度的工作液。

8、如权利要求5所述的方法，其特征在于，所述化学发光底物的发光剂为1,2-二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺。

9、如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述1,2-二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP- Star。

10、如权利要求5所述的方法，其特征在于，所述化学发光底物包括A液和B液，其中，

基于1000mL所述化学发光底物A液，包括1.7716g 鲁米诺、0.051g 4-羟基联苯、0.012g 4-碘苯硼酸、11.4g 硼酸、4.9g 硼砂，其pH值为8.0~10.0；

基于1000mL所述化学发光底物B液，包括0.329g 过氧化脲、1ml Tween20、51.58g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.74g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，其pH值为7.0~7.6。

一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明属于临床血液免疫检测技术领域，涉及一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

胰岛素依赖型糖尿病（Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM）或称 I-型糖尿病是一种渐进的慢性损伤性疾病，它能损害胰岛素的产生和分泌，以及改变血糖代谢机制。胰岛素是由胰岛细胞或 Langerhans 细胞合成并分泌的一种激素。而在 IDDM 患者中，其体内的自身抗体会引起胰岛细胞的免疫性损伤，从而破坏了胰岛素的正常合成功能，此类正常的自身免疫性疾病可由遗传以及有毒物质接触，病毒感染和各种精神压力所引发。

胰岛细胞抗体（Islet cell antibody, ICA）在近期的 IDDM 发病患者研究中表明：70%的患者带有 ICA，而对照组非糖尿病的人群中仅有 0.1%~0.5%带有 ICA。在 IDDM 患者的直系亲属中进行了 ICA 检测，表明这些人比一般人患 IDDM 机率要高，IDDM 患者的直系亲属其 ICA 为阳性，将会发展为糖尿病，在普通人群和 IDDM 患者的同胞及家族中进行 ICA 的早期检测是很重要的，可以鉴别出患糖尿病的高危个体，血液中含有 ICA 是一项 IDDM 发病的指标。所以，血清检测 ICA 可成为一种 IDDM 早期诊断的重要手段。

迄今为止，ICA 的检测方法主要有：酶联免疫分析（EIA）和放射免疫分析（RIA），应用最广泛的为酶联免疫分析（EIA）。

放射免疫分析，因其使用放射性元素作为标记物，因此对环境有一定污染性，并存在操作复杂，试剂保存时间短等缺点。酶免疫分析法虽然应用较为普遍，但其灵敏度低，影响因素较多，易造成假阴性和假阳性。

化学发光免疫分析 (CLIA), 是以发光物质取代了酶联显色底物, 从而极大地提高了检测灵敏度, 同时, 因为不使用放射性物质, 避免了放射性污染和试剂保存时间短等问题, 但目前化学发光免疫分析在胰岛细胞抗体 (ICA) 的检测方面仍未见应用。

发明内容

本发明的发明人为了解决上述问题提出并完成了本发明。

本发明的目的是提供一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒。

根据本发明的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒包括: 胰岛细胞抗体阴性和阳性对照品; 样品稀释液; 胰岛细胞抗原包被的固相载体; 羊抗人 IgG 抗体酶标记物; 化学发光底物; 以及浓缩洗涤液。

根据本发明的试剂盒, 其中, 所述样品稀释液为灭活的小牛血清; 所述固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒; 所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶; 所述化学发光底物为 1,2-二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺。

本发明的再一目的是提供一种制备上述试剂盒的方法。

根据本发明制备上述试剂盒的方法, 包括以下步骤:

1) 配制胰岛细胞抗体阴性和阳性对照品: 用高滴度的胰岛细胞抗体阳性人血清混合成阳性血浆 (血浆份数大于 5), 56℃ 灭活 1 小时后, 使用新生牛血清进行适当稀释, 除菌过滤, 即为阳性对照; 将胰岛细胞抗体检测为阴性的正常人血清混合 (血浆份数大于 10), 56℃ 灭活 1 小时后, 除菌过滤, 即为阴性对照;

2) 配制样品稀释液: 在小牛血清中加入 1‰Proclin 300 混匀;

3) 以胰岛细胞抗原包被微孔板、塑料珠和塑料管: 用 0.050M pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成所需浓度的包被液, 并将其负载于固相载体上, 然后用生理盐水洗涤, BSA 封闭液室温封闭 3 小时, 除湿干燥并用铝箔袋封装;

其中, 所述 0.050M 的碳酸盐缓冲液配方为: 无水碳酸钠 1.59g, 碳酸氢钠 2.94g, 去离子水 1000mL。

所述 BSA 封闭液的配制方法为：称取 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，10g BSA，1mL Proclin300，加双蒸水定容至 1000mL，溶解混匀。

以胰岛细胞抗原联结磁性颗粒：

将粒径为 2~3 μm 的磁颗粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，静置 20~25min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次，并用该溶液进行悬浮，浓度为 50~100mg/mL；每毫升悬浮液中加入胰岛细胞抗原 60~100 μg ，在 4℃ 下搅拌过夜后，加磁场，静置 10~15min，倒出上清，用含有 0.2%~1.0% 牛血清白蛋白、0.5%~1.0% 酪蛋白、0.02mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含吐温-20 和叠氮化钠防腐剂的磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次，并用该溶液配制成 5~10 mg/mL 的工作液。磁颗粒溶液在 4℃ 保存，不应冻存，用时轻轻摇匀。

4) 以酶标记羊抗人 IgG 抗体；

当以辣根过氧化物酶标记时，采用过碘酸钠法：溶解 4.4mg HRP 于 1mL 蒸馏水中，加入 0.4mL 过碘酸钠（50mmol/L）室温搅拌 20min，经 1mmol/L 醋酸钠缓冲液，pH 值为 4.4 透析后加入 8mg 羊抗人 IgG 抗体，搅拌 2h，最后用 200mmol/L NaBH_4 进行还原，经 0.02M PBS 缓冲液透析后，加等体积甘油，-20℃ 以下保存。

当以碱性磷酸酶标记时，羊抗人 IgG 抗体用经典的戊二醛法与碱性磷酸酶偶联，对 PBS 充分透析，加等体积甘油，-20℃ 以下保存。

5) 配制化学发光底物：辣根过氧化物酶底物的发光剂为鲁米诺或异鲁米诺；碱性磷酸酶底物的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物；

具体地，所述辣根过氧化物酶的底物包括 A 液和 B 液，其中，

所述化学发光底物 A 液，包括 10mM 鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯、0.05mM 4-碘苯硼酸、0.2M pH8.7 硼酸-硼砂缓冲液，其 pH 值为 8.0~10.0；

所述化学发光底物 B 液，包括 3.5mM 过氧化脲、0.1% Tween20、0.2M pH7.2 磷酸盐缓冲液，其 pH 值为 7.0~7.6。

所述碱性磷酸酶的底物配方为：24g Tris, 15mL HCl, 160g NaCl, 4g KCl, 1mL Proclin 300, 200mL AMPPD, 1000mL 双蒸水。

6) 配制浓缩洗涤液；

具体地，所述浓缩洗涤液的配方为：58g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 160g NaCl, 1mL Tween-20, 1mL Proclin 300, 1000mL 去离子水，pH 值 7.2~7.4。

7) 分装上述阴性和阳性对照品、样品稀释液、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液；

8) 组装为成品。

本发明所制备的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析试剂盒，其各项指标均优于酶联免疫试剂盒的分析水平，尤其灵敏度有了大幅提高，同时又避免了放射免疫法的放射性污染、有效期短、操作复杂等缺点，为 I 型糖尿病的诊断提供了更为特异、快速、可靠的依据。

具体实施方式

实施例 1 胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的制备

一、辣根过氧化物酶（HRP）标记抗体的制备

溶解 4.4mg HRP 于 1mL 蒸馏水中，加入 0.4mL 过碘酸钠（50mmol/L）室温搅拌 20min，经 1mmol/L 醋酸钠缓冲液，pH 值为 4.4 透析后加入 8mg 羊抗人 IgG 抗体，搅拌 2h，最后用 200mmol/L NaBH_4 进行还原，经 0.02M PBS 缓冲液透析后，加等体积甘油， -20°C 以下保存。

采用方阵法选择酶标记物的工作浓度为 1:5000。

二、胰岛细胞抗体阴性和阳性对照品配制

阳性对照血清：经确切方法确定的高滴度胰岛细胞抗体阳性人血清混合成阳性血浆（Positive Pool，血浆份数大于 5）， 56°C 1 小时加温灭活后，使用新生牛血清进行适当稀释，加入生物防腐剂和万分之一（W/V）的食品红使之成为红色，

除菌过滤，2~8℃保存。

阴性对照血清：选用胰岛细胞抗体检测为阴性的人血清混合（血浆份数大于10），56℃ 1小时加温灭活后，除菌过滤，2~8℃保存。

三、固相包被板的制备

（1）包被

采用0.050M pH值为9.6的碳酸盐缓冲液与适当浓度的胰岛细胞抗原混合制成包被液，并将其负载于固相载体上；

具体地，所述0.050M的碳酸盐缓冲液的配方为：

无水碳酸钠	1.59g
碳酸氢钠	2.94g
去离子水	1000mL

溶解混匀后，调整pH值至9.6，加入2.0mg胰岛细胞抗原混匀，然后加入微孔板各孔中，每孔110μL，4℃放置过夜。

（2）洗涤：用生理盐水洗三次。

（3）封闭

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9g
BSA	10g
Proclin300	1mL
双蒸水	定容至 1000mL

将上述试剂称量好放入洁净容器中，加双蒸水定容，溶解混匀，测定pH值为7.0。每孔分别加入封闭液300μL，室温放置3小时。

（4）干燥及封装

甩掉封闭液，在吸水纸上拍干。室温除湿干燥24小时。立即用铝箔袋进行封

装，贴签后置 2~8℃保存。

四、配制样品稀释液

基于 1000mL 小牛血清，加 1mL Proclin 300，混匀。

五、配制化学发光底物液

本发明所使用的辣根过氧化物酶(HRP)的化学发光底物液的配制方法：

(1) 化学发光底物 A 液：

鲁米诺	1.7716g
4-羟基联苯	0.051g
4-碘苯硼酸	0.012g
硼酸	11.4g
硼砂	4.9g
双蒸水	定溶 1000mL

pH 8.0~10.0

(2) 化学发光底物 B 液：

过氧化脲	0.329g
Tween20	1ml
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	51.58g
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	8.74g
双蒸水	定溶 1000mL

pH 7.0~7.6

使用方法：使用前将 A 液与 B 液按 1：1 比例混合后使用。

六、20 倍浓缩洗涤液配方

Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	58g
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	2g
NaCl	160g

Tween-20	1mL
Proclin 300	1mL
去离子水	1000mL

调整 pH 至 7.2~7.4

七、半成品及成品组成

上述步骤所得产品分装即为半成品，经质检合格后组装即为胰岛细胞抗体成品试剂盒，组装成试剂盒后还需抽检合格才能出厂。

实施例 2 胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的制备

一、碱性磷酸酶标记抗体的制备

羊抗人 IgG 抗体用经典的戊二醛法与碱性磷酸酶偶联，对 PBS 充分透析，加等体积甘油，-20℃ 以下保存。

采用方阵法选择酶标记物的工作浓度为 1:3000。

二、配制化学发光底物

本发明所使用的碱性磷酸酶（ALP）的化学发光底物液的配方如下：

Tris	24g
HCl	15mL
NaCl	160g
KCl	4g
Proclin 300	1mL
双蒸水	1000mL
AMPPD	200mL

其余步骤均以与实施例 1 相同的方法制备本发明的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒。

实施例 3~4 制备本发明的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

除分别以塑料珠、塑料管作为固相载体外，其余均以与实施例 1 相同的方法制备本发明的胰岛细胞抗体测定试剂盒。

实施例 5~6 制备本发明的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

除分别以塑料珠、塑料管作为固相载体外，其余均以与实施例 2 相同的方法制备本发明的胰岛细胞抗体测定试剂盒。

实施例 7~8 以磁性颗粒为固相载体制备本发明的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

胰岛细胞抗原联结磁性颗粒的制备方法如下：

将粒径为 $2\sim 3\ \mu\text{m}$ 的磁颗粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，静置 20~25min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次，并用该溶液进行悬浮，浓度为 50~100mg/mL；每毫升悬浮液中加入胰岛细胞抗原 60~100 μg ，在 4℃ 下搅拌过夜后，加磁场，静置 10~15min，倒出上清，用含有 0.2%~1.0% 牛血清白蛋白、0.5%~1.0% 酪蛋白、0.02mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含吐温-20 和叠氮化钠防腐剂的磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次，并用该溶液配制成 5~10 mg/mL 的工作液。磁颗粒溶液在 4℃ 保存，不应冻存，用时轻轻摇匀。

其余步骤均以与实施例 1、2 相同的方法制备本发明的胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒。

实施例 9 本发明试剂盒的使用方法

以上实施例 1 制备的试剂盒的具体操作如下：

- 1) 自 4℃ 冰箱中取出试剂盒，室温平衡 15~30 分钟。
- 2) 取出所需量的包被板条，插入板架上。
- 3) 设阴性对照三孔，阳性对照两孔，空白孔一孔，分别加入 100 μL 阴性对照、阳性对照和血清样品(样品预先用样品稀释液以 1: 100 倍稀释)于相应的孔中（空白孔除外），用封口膜将板条封好，置 37℃ 温育 1 小时。

4) 甩去反应液，每孔加满 20 倍稀释后的洗涤液，洗板 5 次，最后在干净的吸水纸上扣干。

5) 每孔加入酶标记物 100 μ L，空白孔除外，用封口膜将板封好，置 37℃温育 1 小时。

6) 甩去反应液，每孔加满 20 倍稀释后的洗涤液，洗板 5 次，最后在干净的吸水纸上扣干。

7) 将化学发光底物 A 液和 B 液等比例混合，每孔加 100 μ L，用微量震荡器混匀，室温（20~25℃）避光反应 5 分钟。必须于加化学发光底物液后的第 5~30 分钟内测量，在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度（RLU），测量时间 1 秒/孔。

8) 各孔的 RLU 值与 Cut off 值进行比较，Cut off 值=15 倍阴性对照平均值，样品测定值大于 Cut off 值，则判断为阳性，否则为阴性。

实施例 10 本发明试剂盒的方法学鉴定及与酶联免疫试剂盒的临床对比试验

1)按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定，结果如下：

表 1 本发明试剂盒的性能指标

原理			化学发光法
灵敏度			0.8ng/ml
精密性	分析内 (n=10)		3.5%
	分析间 (n=10)		10.7%
稳定性	灵敏度		1.1 ng/ml
(37℃考 核 7 天)	精密性	分析内 (n=10)	6.3%
		分析间 (n=10)	12.2%

2) 取用医院临床收集的 I 型糖尿病患者血清标本 30 份, II 型糖尿病患者血清标本 75 份, 正常人血清标本 100 份。分别使用本发明实施例 1 的试剂盒和深圳安群酶联免疫试剂盒进行血样检测, 统计实验结果并进行分析。

实验结果如下:

表 2 两种测定试剂盒对样本的检测结果

	本发明试剂盒		深圳安群试剂盒	
	+	-	+	-
正常血清样本 (n=100)	0	100	0	100
I 型糖尿病样本 (n=30)	22	8	21	9
II 型糖尿病样本 (n=75)	7	68	5	70

由表 1 所述数据表明, 本发明的试剂盒具有良好的精密性和稳定性。

根据表 2 所述数据可知, 100 例正常人血清样本, 本发明试剂盒与深圳安群试剂盒的检测结果均为阴性, 完全符合临床; I 型糖尿病和 II 型糖尿病样本的阳性检出率, 深圳安群试剂盒分别为 70.0%和 6.7%, 而本发明试剂盒分别为 73.3%和 9.3%, 比深圳安群试剂盒略高, 与有关文献报道相近, 充分显示了本发明试剂盒的优越性和临床使用价值。

专利名称(译)	一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101571544A	公开(公告)日	2009-11-04
申请号	CN200810105417.9	申请日	2008-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
[标]发明人	高将 应希堂 宋胜利 胡国茂 唐宝军 于尚永		
发明人	高将 应希堂 宋胜利 胡国茂 唐宝军 于尚永		
IPC分类号	G01N33/569 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床血液免疫检测技术领域，涉及一种胰岛细胞抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒的组分主要有：阴性和阳性对照品；样品稀释液；胰岛细胞抗原包被的固相载体；羊抗人IgG抗体酶标记物；化学发光底物和浓缩洗涤液。制备上述各组分并组装即为成品试剂盒。本发明的试剂盒用于检测血清中的胰岛细胞抗体，对I型糖尿病的早期诊断具有重要意义。

原理		化学发光法
灵敏度		0.8ng/ml
精密性	分析内 (n=10)	3.5%
	分析间 (n=10)	10.7%
稳定性	灵敏度	
(37℃考 核 7 天)	精密性	1.1 ng/ml
	分析内 (n=10)	6.3%
	分析间 (n=10)	12.2%