



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725154 A
(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201811166782.0

(22)申请日 2018.10.08

(71)申请人 杭州康知生物科技有限公司

地址 311100 浙江省杭州市余杭区余杭经济开发区新颜路22号201G

(72)发明人 张乐之 余铭恩 胡祥叶 王立童
李丹 吴滨

(74)专利代理机构 苏州中合知识产权代理事务所(普通合伙) 32266

代理人 龙涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

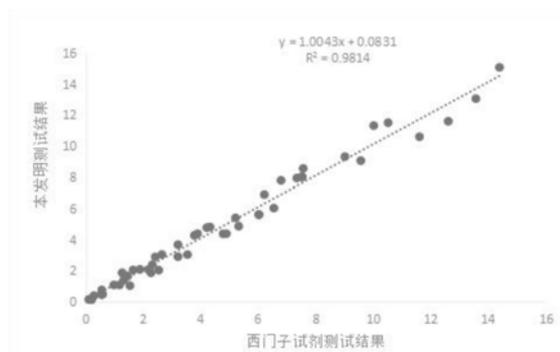
权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法

(57)摘要

本发明涉及一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒和测定方法。试剂盒由荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液和免疫层析试纸条组成,抗体溶液包含特殊浓度的荧光微球,荧光微球分别是时间分辨荧光微球和量子点荧光微球。免疫层析试纸条包括底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线;T线上包被IgG4,C线上包被羊抗鼠IgG。本发明提供的测定方法,测定线性范围0.031~8g/L,线性相关系数为0.9987;灵敏度为0.0169g/L;精密度平均为CV<15%;准确度平均回收率为101.5%;与西门子特定蛋白分析仪测定结果高度相关($r=0.9814$)。该方法检测IgG4需时短,检测结果准确,操作流程简单,无需大型仪器设备,适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。



1. 一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液,其中IgG4单克隆抗体溶液中包含荧光微球标记的IgG4单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述试纸条包括底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜设置在硝酸纤维素膜和吸水垫之间,硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线。

3. 根据权利要求2所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述T线上包被IgG4,C线上包被羊抗鼠IgG,T线上包被的IgG4和血液样本中的IgG4能够和荧光微球标记的IgG4单克隆抗体产生特异性竞争结合反应,羊抗鼠IgG与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体能够产生抗原抗体特异性结合反应。

4. 根据权利要求1所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述荧光微球分别是时间分辨荧光微球或量子点荧光微球中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述IgG4单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

(1) 以人IgG4为靶抗原,分析并选择人IgG4的铰链区为抗原表位,合成IgG4多肽并偶联BSA蛋白,作为免疫原;

(2) 将步骤(1)得到的免疫原免疫小鼠,取其脾脏细胞与sp2/0骨髓瘤细胞融合,使用多肽多轮筛选最终得到分泌IgG4单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(3) 将杂交瘤细胞株分别制备Balb/c小鼠腹水,使用磁珠法纯化单克隆抗体。

6. 根据权利要求1所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于: IgG4片段的多肽,其序列如下:Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro。

7. 根据权利要求1所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液制备方法包括以下步骤:

(1) 荧光微球加入硼酸缓冲液中,加入EDC,混匀,室温孵育10-30分钟;

(2) 离心,去上清,重悬后加入IgG4单克隆抗体,室温孵育1-2小时;

(3) 封闭1小时,离心,用微球保存液重悬并清洗,置2-8℃保存。

8. 根据权利要求1所述的IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

(1) 采用三维点膜喷金仪,将IgG4和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜上,T线上包被IgG4,C线上包被羊抗鼠IgG;

(2) 在干燥箱中干燥后,将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装;

(3) 切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

9. 一种采用权利要求1-9中任一项所述的试剂盒进行IgG4荧光免疫层析测定方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 将不同浓度的IgG4标准品与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液混合;

(2) 混合后取100ul滴加到免疫层析试纸条加样孔,15分钟后,通过使用干式免疫荧光分析仪读取检测结果;

(3) 根据荧光值绘制标准曲线,再将待测样品通过上述方法进行检测。

一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法。

背景技术

[0002] IgG4是免疫球蛋白G的一个亚型。研究发现,IgG4与许多疾病相关,因此被学者统称为IgG4相关性疾病。该病是近年来新认识的一种原因不明的慢性、进行性自身免疫性疾病,且并不少见,极易误诊。该病表现为各种组织和脏器的肿胀、炎症和纤维化等,B超、CT或MRI检查后常被诊断为肿瘤,但病理活检却找不到肿瘤细胞,造成误开刀,难治疗。尽管该病的临床表现差异很大,损害部位也不同,但有一个共同特点,就是血液中IgG4升高。

[0003] 鉴于病理活检的依从性较差,血液中IgG4的定量测定对IgG4相关性疾病的诊断和疗效观察就显得至关重要。血液中IgG4的测定方法有酶免法、西门子特定蛋白仪速率散射免疫比浊法及免疫层析胶体金法。酶免法虽价廉,但做定量测定结果不稳定,已逐渐被大医院检验科淘汰;西门子特定蛋白仪属大型仪器设备,测定结果准确稳定,但价格高,不适合基层医院使用,又由于体型大,不便于大医院门、急诊检验科使用。

[0004] 专利申请号为CN103837686A的中国发明专利,公开一种检测人免疫球蛋白G4的试剂盒及其制备方法,采用免疫层析胶体金法,测定仪器便宜,且可测定血清、血浆或全血,但其定量测定结果不够准确,应用效果较差,亟待荧光免疫层析法替代。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的不足,本发明提供一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒和测定方法,本发明通过构建IgG4及研制IgG4单克隆抗体,分别应用时间分辨荧光微球和量子点荧光微球作标记探针,建立了IgG4荧光免疫层析测定方法。荧光免疫层析法是用荧光微球作标记探针建立的方法;荧光微球是新近被推崇应用效果最佳的荧光探针纳米新型材料。荧光免疫层析技术作为一项新型免疫检测技术,既保留了传统胶体金试纸条的现场快速检测优点,又加入了灵敏度高、稳定性好、受自然荧光干扰低等优点,同时其配套使用的设备精巧,适合医院门诊、急诊检验科使用。

[0006] 本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液,其中IgG4单克隆抗体溶液中包括荧光微球标记的IgG4单克隆抗体。

[0008] 优选的是,所述试纸条包括底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜设置在硝酸纤维素膜和吸水垫之间,硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线。

[0009] 上述任一方案优选的是,所述T线上包被IgG4,C线上包被羊抗鼠IgG,T线上包被的IgG4和血液样本中的IgG4能够和荧光微球标记的IgG4单克隆抗体产生特异性竞争结合反应,羊抗鼠IgG与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体能够产生抗原抗体特异性结合反应。

[0010] 上述任一方案优选的是,所述荧光微球分别是时间分辨荧光微球或量子点荧光微

球中的至少一种。

[0011] 上述任一方案优选的是,所述T线上IgG4包被浓度范围是0.1~1.0mg/ml; C线上羊抗鼠IgG包被浓度范围是0.8~1.5mg/ml。

[0012] 上述任一方案优选的是,所述荧光微球标记的IgG4单克隆抗体浓度范围是 0.2~0.5mg/ml。

[0013] 上述任一方案优选的是,所述IgG4单克隆抗体制备方法包括以下步骤:

[0014] (1) 以人IgG4为靶抗原,分析并选择人IgG4的铰链区为抗原表位,合成 IgG4多肽并偶联BSA蛋白,作为免疫原;

[0015] (2) 将步骤(1)得到的免疫原免疫小鼠,取其脾脏细胞与sp2/0骨髓瘤细胞融合,使用多肽多轮筛选最终得到分泌IgG4单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0016] (3) 将杂交瘤细胞株分别制备Balb/c小鼠腹水,使用磁珠法纯化单克隆抗体。

[0017] 上述任一方案优选的是,所述IgG4片段的多肽,其序列如下:Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro。

[0018] 上述任一方案优选的是,所述荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液制备方法包括以下步骤:

[0019] (1) 荧光微球加入硼酸缓冲液中,加入EDC,混匀,室温孵育10-30分钟;

[0020] (2) 离心,去上清,重悬后加入IgG4单克隆抗体,室温孵育1-2小时;

[0021] (3) 封闭1小时,离心,用微球保存液重悬并清洗,置2-8℃保存。

[0022] 上述任一方案优选的是,所述步骤(1)中EDC的浓度为10mg/ml。

[0023] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中IgG4单克隆抗体的浓度为2mg/ml。

[0024] 上述任一方案优选的是,所述免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

[0025] (1) 采用三维点膜喷金仪,将IgG4和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜上,T线上包被IgG4,C线上包被羊抗鼠IgG;

[0026] (2) 在干燥箱中干燥后,将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装;

[0027] (3) 切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

[0028] 本发明还提供一种采用上述试剂盒IgG4进行荧光免疫层析的测定方法,包括以下步骤:

[0029] (1) 将不同浓度的IgG4标准品与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液混合;

[0030] (2) 混合后取100u1滴加到免疫层析试纸条加样孔,15分钟后,通过使用干式免疫荧光分析仪读取检测结果;

[0031] (3) 根据荧光值绘制标准曲线,再将待测样品通过上述方法进行检测。

[0032] 优选的是,所述步骤(1)不同浓度IgG4标准品为0.1mol/L的PBS溶液配制浓度,分别为:0.031g/L、0.062g/L、0.125g/L、0.250g/L、0.50g/L、1.00g/L、2.00g/L、4.00g/L、8.00g/L。

[0033] 上述任一方案优选的是,当标记探针为时间分辨荧光微球时,硝酸纤维膜上 IgG4包被浓度为0.5mg/ml,硝酸纤维膜上羊抗鼠IgG包被浓度为1.0mg/ml,抗体溶液中偶联荧光微球的IgG4单克隆抗体浓度为0.3mg/ml。

[0034] 上述任一方案优选的是,当标记探针为量子点荧光微球时,硝酸纤维膜上 IgG4包被浓度0.6mg/ml,硝酸纤维膜上羊抗鼠IgG包被浓度为0.9mg/ml,抗体溶液中偶联荧光微球

的抗IgG4单克隆抗体浓度为0.3mg/ml。

[0035] 有益效果

[0036] (1) 本发明通过构建IgG4抗原和制备IgG4单克隆抗体,研制了相关试剂盒,建立了IgG4荧光免疫层析测定方法。试剂盒由荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液和免疫层析试纸条组成。

[0037] (2) 抗体溶液包含特殊浓度的荧光微球;所述荧光微球分别是时间分辨荧光微球和量子点荧光微球。试纸条包括依次相连的底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜和吸水垫之间为硝酸纤维素膜;所述硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线;所述T线上包被IgG4,C线上包被羊抗鼠IgG。

[0038] (3) 测定时,血液样本中IgG4和T线上包被的IgG4分别与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体产生特异性竞争结合反应,T线信号强弱与样本中IgG4的量成负相关。

[0039] (4) 本发明提供的测定方法,经方法学实验比对,测定线性范围0.031~ 8g/L,线性相关系数为0.9987;灵敏度为0.0169g/L;精密度平均为CV<15%;准确度平均回收率为101.5%;与西门子特定蛋白分析仪测定结果高度相关 ($r=0.9814$)。IgG4荧光免疫层析测定方法检测时间短,检测结果准确,操作流程简单,无需大型仪器设备,适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。

[0040] (5) 该法是替代免疫层析胶体金法既价廉,又准确稳定的定量测定IgG4的新方法,可广泛应用于基层医院及大医院门、急诊检验科对IgG4相关性疾病的检测。

[0041] (6) IgG4荧光免疫层析测定试剂盒,目前国内还是空白,药监局还没有批文产品。

附图说明

[0042] 图1是IgG4荧光免疫层析试纸条;箭头所指分别为加样的位置和层析方向;

图2是标准液浓度与信号值-Logit-Log拟合曲线图,图中 $y=\ln(p/q)$, $x=\lg(\text{浓度})$,其中 $p=OD/OD_0$, $q=1-p$,OD为测量信号值 $T/(T+C)$ 比值,OD₀为浓度为0的测量值 $T/(T+C)$ 比值。

图3为以西门子特定蛋白分析仪试剂的测试结果作为横坐标,本发明试剂条的测量值为纵坐标绘制标准曲线。两组结果的相关性 $R^2=0.9814$ 。

[0043] 附图标记说明

[0044] 1、样本垫;2、硝酸纤维素膜;3、T线;4、C线;5、吸水垫。

具体实施方式

[0045] 为了进一步了解本发明的技术特征,下面结合具体实施例对本发明进行详细地阐述。实施例只对本发明具有示例性的作用,而不具有任何限制性的作用,本领域的技术人员在本发明的基础上做出的任何非实质性的修改,都应属于本发明的保护范围。

[0046] 下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0047] 实施例1:免疫原的制备

[0048] IgG4片段的多肽,其氨基酸序列如下:Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro。以人IgG4为靶抗原,利用生物软件DNAssist2.0分析其抗原表位序列的亲水

性及抗原性,选择其铰链区序列为抗原表位,同时,序列比较结果显示所选择的抗原表位序列具备广谱性,是所有人IgG4共有表位,并且该表位与其它蛋白序列无明显同源性,仅存在于人IgG4。化学合成人IgG4铰链区氨基酸序列,得到多肽。

[0049] 多肽偶联BSA蛋白,具体方法如下:4.6mgSPDP溶解于740 μ lDMSO,终浓度为20mM。0.1008gBSA溶解于2mlPBS-EDTA溶液中,室温静置1h。HiTrap Deasltng column脱盐柱洗脱多余的SPDP。4mg多肽加入偶联好的BSA-EDTA体系中室温过夜。

[0050] 实施例2: IgG4单克隆抗体制备

[0051] 取4-6周龄雌性Balb/c小鼠,基础免疫每只小鼠皮下多点注射福氏完全佐剂乳化的100 μ g BSA偶联蛋白,共400 μ l/只。20天后进行第二次加强免疫,方法为取80 μ g BSA偶联蛋白用福氏不完全佐剂乳化,共400 μ l/只,皮下多点注射。第三次加强免疫在15天以后,方法与第二次加强免疫相同。15天后,处死小鼠,取其脾脏制备细胞悬液,与生长状态良好的sp2/0(小鼠骨髓瘤细胞),通过聚乙二醇(Sigma公司)使融合。另外,再加入等体积的饲养细胞,混匀后分置于96孔细胞板(200 μ l/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养箱培养。5天后,半保留换液,10天后采用间接酶联免疫吸附法检测96孔细胞培养板中培养杂交瘤细胞的上清。具体方法如下:

[0052] 人IgG4(杭州贤至生物科技有限公司)经包被液稀释后(终浓度为10 μ g/mL),以100 μ l/孔加入酶标板(无锡国盛生物工程有限公司),4 $^{\circ}$ C包被12小时后通过DEM-3型洗板机(中山大学达安基因股份有限公司)用洗涤液洗涤1次;加入封闭液,200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1小时,洗板机洗板1次;加待检细胞培养上清、阳性对照血清及阴性对照样本,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育35min后,洗涤液洗涤3次;加HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗鼠IgG,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育35分钟后,洗涤液洗涤四次;每孔加显色液A和显色液B各50 μ l,37 $^{\circ}$ C避光显色10分钟后,加终止液终止反应,50 μ l/孔,酶标仪450nm波长空白孔校零后读取OD值。

[0053] 相关溶液配方如下:

[0054] 包被液:Na₂CO₃1.59g,NaHCO₃2.93g,加双蒸水定容至1000mL(pH9.6)。

[0055] 封闭液:Na₂HPO₄.12H₂O 2.68g,NaH₂PO₄.2H₂O 0.39g,NaCl 8.5g,20g牛血清白蛋白,加双蒸水定容至1000mL(pH7.4)。

[0056] 洗涤液:Na₂HPO₄.12H₂O 2.68g,NaH₂PO₄.2H₂O 0.39g,NaCl 8.5g,Tween-20 0.5mL,加双蒸水定容至1000mL(pH7.4)。

[0057] 显色液A:200mg TMB溶于100mL无水乙醇,加双蒸水定容至1000mL。

[0058] 显色液B:柠檬酸2.1g,Na₂HPO₄.12H₂O 71g,加双蒸水定容至1000mL。

[0059] 使用时:1mL显色液A+1mL显色液B+0.4 μ l 30%H₂O₂

[0060] 终止液:2M H₂SO₄,21.7mL浓H₂SO₄加双蒸水定容至1000mL。

[0061] 对于检测阳性的杂交瘤细胞克隆,再使用有限稀释法进行亚克隆,挑选单个细胞培养并通过间接酶联免疫吸附法检测。经过连续两次全阳性亚克隆,单克隆细胞株。

[0062] 取6-8周龄的健康Balb/c雄鼠,腹腔注射液体石蜡,每只500 μ l,3天后腹腔注射单克隆细胞(约1 \times 10⁶个/只),6-8天后,小鼠腹部鼓起,收集腹水。用磁珠法抗体纯化试剂盒(苏州海狸生物医学工程有限公司),通过样品处理,磁珠预处理,抗体吸附,磁珠洗涤,抗体洗脱,抗体中和一系列步骤,得到的即为纯化的IgG4单克隆抗体。

[0063] 实施例3:荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液制备

[0064] 称取EDC 1.5mg,加入150ul 0.05M/pH 8.0硼酸缓冲溶液涡旋溶解,配制为10mg/ml溶液。取0.05M/pH 8.0硼酸缓冲溶液40ul于1.5ml离心管中,加入10ul荧光微球,漩涡振荡,混匀。加入1.5ul的EDC (10mg/ml) 溶液,室温振荡活化15min,注意:EDC加入后立即混匀。15000r,10℃,10min离心,弃上清,用40ul 0.05M硼酸缓冲溶液复溶,超声分散,100W,间隔超声1s*10,加入 10ul IgG4单克隆抗体原液(杭州康知生物有限公司2mg/ml)。置于500R,4℃摇床过夜震荡。

[0065] 加入5.5ul 10倍浓缩封闭液,使BSA最终浓度为1%,置于摇床封闭2h避光震荡。离心,15000R,10℃,10min,弃上清,用150ul标记储存液复溶,超声分散,100W,间隔超声1s*10。再次离心后用150ul标记储存液复溶,超声分散,100W,间隔超声1s*10,置于4℃恒温保存。

[0066] 相关溶液配制:

[0067] 0.05M/pH 8.0硼酸缓冲溶液:称取9.354g四硼酸钠加500ml超纯水溶解得 0.05M四硼酸钠溶液,测得PH为9.5。称取1.546g硼酸加500ml超纯水溶解得0.05M 硼酸溶液,使用上述四硼酸钠溶液调节硼酸PH至8.0。

[0068] 10倍浓缩封闭液:70ml超纯水中加入6.02g Tris,再加入6N盐酸调节PH至 8.0,加超纯水定容至100ml为0.5M Tris-HCl溶液。取10ml该溶液加入50ul Tween-20和1g BSA溶解得含10%BSA的10倍封闭液。

[0069] 实施例4:包被IgG4和羊抗鼠IgG的免疫层析试纸条的制备

[0070] 一种免疫层析试纸条,试纸条包括底板、样本垫1、硝酸纤维素膜2和吸水垫 5,样本垫1、硝酸纤维素膜2和吸水垫5设置在底板上部,所述的样本垫1和吸水垫5之间为硝酸纤维素膜2,硝酸纤维素膜2上依次设置检测T线3和质控C线4,T 线3上包被IgG4,C线4上包被羊抗鼠IgG。T线3上包被的IgG4和血液样本中的IgG4 分别与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体产生特异性竞争结合反应,羊抗鼠IgG与荧光微球标记的IgG4单克隆抗体产生抗原抗体特异性结合反应。

[0071] T线上IgG4包被浓度范围是0.1~1.0mg/ml;C线上羊抗鼠IgG包被浓度范围是 0.8~1.5mg/ml。

[0072] 采用三维点膜喷金仪,将IgG4和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜2上,分别作为检测线(T线)和质控线(C线)。在干燥箱中37℃干燥2h,将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装好后,切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

[0073] 具体的,本实施例中配制划膜稀释液:在950ul水中加入50ul异丙醇,混合均匀。得到5%异丙醇溶液,使用前用0.2um的滤膜过滤。

[0074] C线溶液配制:C线使用羊抗鼠IgG(杭州贤至生物科技有限公司,浓度为 7.9mg/ml),配制前将其4000rpm离心5分钟,取上清液用划膜稀释液稀释到 1.0mg/ml,混匀。

[0075] T线溶液配制:T线使用IgG4(浓度为5.2mg/ml),配置前将其4000rpm离心5 分钟,取上清液用划膜稀释液稀释到0.5mg/ml。

[0076] 划线:在三维划膜仪(金标公司,HM3030)上,分别设置C线溶液的量 为 0.9ul/cm,T线溶液的量 为1ul/cm。初始化仪器后分别用C线和T线溶液在硝酸纤维素膜(NC膜)上进行划线,划膜结束后将硝酸纤维素膜(NC膜)置37℃过夜烘干。

[0077] 组装:将吸水纸,划线NC膜,样本垫依次组装在PVC粘性底板上,切割成条后装入试

纸条卡盒中,加干燥剂保存在湿度 $\leq 20\%$ 的环境中。图1为IgG4荧光免疫层析试纸条。

[0078] 实施例5:标准曲线的建立

[0079] 使用10mM PBS将IgG4 (8.0mg/ml) 稀释至4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.031mg/ml,用空白稀释液做0值,形成系列梯度标准液。将荧光微球标记的IgG4单克隆抗体用稀释液稀释至工作浓度(1:1000稀释),取配制的梯度浓度的标准液5u1,加入到100u1工作浓度的荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液中,混匀后取100u1加入上述条件的试纸条样本孔中。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线信号并计算测量值 $T/(T+C)$,如表1所示。

[0080] 表1.标准液浓度与信号值比值对应表

[0081]	样本浓度 g/l	0.00	0.031	0.063	0.125	0.250
	T/(T+C)	0.850	0.774	0.736	0.698	0.625
[0081]	样本浓度 g/l	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
	T/(T+C)	0.541	0.432	0.351	0.248	0.178

[0082] 将标准液浓度与信号值比值按照Logit-log拟合方式进行数据处理,并作图,结果图2所示:

[0083] 图2为标准液浓度与信号值-Logit-Log拟合曲线图,图中 $y = \ln(p/q)$, $x = \lg(\text{浓度})$,其中 $p = OD/OD_0$, $q = 1-p$,OD为测量信号值 $T/(T+C)$ 比值,OD₀为浓度为0的测量值 $T/(T+C)$ 比值。

[0084] 实施例6:试剂条的灵敏度测试

[0085] 将荧光微球标记的IgG4单克隆抗体用稀释液稀释至工作浓度(1:1000稀释),取5u1的10mM PBS作为空白样本,加入到100u1工作浓度的荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液中,混匀后取100u1加入上述条件的试纸条样本孔中。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线信号并计算测量值 $T/(T+C)$,重复测试20次。并计算20次测试结果的平均值M和标准偏差SD。再计算 $M-2SD$ 的值,结果如表2所示。

[0086] 表2 $T/(T+C)$ 、平均值M和标准偏差SD

#	T/(T+C)	#	T/(T+C)
1	0.825	11	0.834
2	0.884	12	0.892
3	0.895	13	0.898
4	0.910	14	0.851
5	0.820	15	0.889
6	0.860	16	0.844
7	0.859	17	0.823
8	0.889	18	0.918
9	0.830	19	0.832
10	0.865	20	0.845
平均值M		0.863	
标准偏差SD		0.031	
变异系数CV		3.64%	
M-2SD		0.800	

[0087]

[0088] 将M-2SD的数值代入到拟合的标准品曲线,计算其对应的浓度值,结果为 0.0169,即试剂的灵敏度为0.0169mg/ml。

[0089] 实施例7:试剂盒批内精密性测试

[0090] 将标记IgG4抗体的荧光微球按1:1000稀释至工作浓度,用IgG4蛋白配制高(7.50g/l)、中(2.50g/l)、低(0.125g/l)三个不同浓度的样本,取5ul样本,加入到100ul的荧光微球工作溶液中,混匀后取100ul加入到本发明的试剂条上样品孔内,反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线信号并计算测量值T/(T+C),重复测试10次,结果如表3所示。

[0091] 表3 测量值T/(T+C)

#	T/(T+C)		
	高值样本 (7.50g/l)	中值样本 (2.50g/l)	低值样本 (0.125g/l)
1	0.184	0.311	0.706
2	0.198	0.329	0.682
3	0.187	0.298	0.694
[0092] 4	0.192	0.282	0.683
5	0.201	0.295	0.704
6	0.191	0.321	0.692
7	0.189	0.301	0.673
8	0.199	0.308	0.698
9	0.187	0.304	0.679
10	0.178	0.293	0.698

[0093] 将T/(T+C)比值代入标准品拟合曲线方程,分别计算其对应的浓度值,并计算 10次测试的浓度值平均值M和标准偏差SD。根据公式变异系数CV(%)=SD/M*100%,分别计算高、中、低三个不同浓度样本的CV(%)值,并计算其平均CV(%)值,如表4所示。

[0094] 表4 高、中、低三个样本的批内CV(%)值计算结果

#	代入拟合曲线计算浓度值		
	高值样本 (g/l)	中值样本 (g/l)	低值样本 (g/l)
1	7.709	2.541	0.101
[0095] 2	6.685	2.218	0.135
3	7.472	2.809	0.117
4	7.099	3.187	0.133
5	7.583	2.475	0.109
6	7.172	2.355	0.120
7	7.320	2.744	0.141
8	6.619	2.600	0.119
9	7.472	2.681	0.135
[0096] 10	8.214	2.421	0.113
平均值 M	7.335	2.603	0.122
标准偏差 SD	0.4749	0.2733	0.0131
变异系数 CV (%)	6.47%	10.50%	10.73%
平均 CV (%)	9.24%		

[0097] 高、中、低三个样本的批内CV(%)值分别为6.47%,10.50%,10.73%,平均 CV

(%)值为9.24%。

[0098] 实施例8:试剂盒批间精密性测试

[0099] 将标记IgG4抗体的荧光微球按1:1000稀释至工作浓度,用IgG4蛋白配制高(7.50g/l)、中(2.50g/l)、低(0.125g/l)三个不同浓度的样本,取5u1样本,加入到100u1的荧光微球工作溶液中,混匀后取100u1加入到本发明的试剂条上样品孔内,反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线信号并计算测量值T/(T+C),并代入标准品拟合曲线计算其浓度值。分别用三个不同批次的测试条重复测试10次,结果如表5-表7所示。

[0100] 表5 高值样本变异系数CV(%)计算结果

#	高值样本 (7.50g/l)		
	第一批	第二批	第三批
1	7.709	7.009	8.209
2	6.685	6.885	7.685
3	7.472	8.172	6.472
[0101] 4	7.099	7.299	7.799
5	7.583	6.790	7.490
6	7.172	7.372	7.572
7	7.320	7.120	6.820
8	6.619	7.619	6.668
9	7.472	8.072	7.483
10	8.214	8.014	7.216
[0102] 平均值M	7.370		
标准偏差SD	0.4950		
变异系数CV (%)	6.72%		

[0103] 表6 中值样本变异系数CV(%)计算结果

#	中值样本 (2.50g/l)		
	第一批	第二批	第三批
1	2.541	2.524	2.591
2	2.218	2.116	2.278
3	2.809	2.518	2.602
4	3.187	3.087	2.987
5	2.475	2.775	2.575
[0104] 6	2.355	2.385	2.657
7	2.744	2.247	2.703
8	2.600	2.400	2.300
9	2.681	2.783	2.485
10	2.421	2.624	2.225
平均值M	2.563		
标准偏差SD	0.2562		
变异系数CV (%)	10.00%		

[0105] 表7 低值样本变异系数CV(%)计算结果

#	低值样本 (0.125g/l)		
	第一批	第二批	第三批
[0106] 1	0.101	0.141	0.132
2	0.135	0.124	0.142
3	0.117	0.153	0.109
4	0.133	0.113	0.136

[0107]	5	0.109	0.124	0.110
	6	0.120	0.117	0.115
	7	0.141	0.108	0.134
	8	0.119	0.126	0.131
	9	0.135	0.119	0.127
	10	0.113	0.131	0.107
	平均值M	0.124		
	标准偏差SD	0.0128		
	变异系数CV (%)	10.28%		

[0108] 高、中、低三个不同浓度样本批间CV (%) 分别为6.72%, 10.00%, 10.28%, 平均CV (%) 为9.00%

[0109] 实施例9: 试剂盒准确度测试

[0110] 将标记IgG4抗体的荧光微球按1:1000稀释至工作浓度。

[0111] 配制三个回收样本: 用IgG4蛋白配制成浓度为5g/l和10g/l两个浓度的溶液。取临床样本3-4份混合均匀后平均分成3份, 每份体积1ml, 在第一份样本中加入 0.1ml的PBS缓冲液, 在第二份样本中加入0.1ml的5g/l的IgG4蛋白溶液, 在第三份样本中加入0.1ml的10g/l的IgG4蛋白溶液。

[0112] 取5u1的回收样本, 加入到100u1的荧光微球工作溶液中, 混匀后取100u1加入到本发明试剂条的样品孔中, 反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪 (苏州和迈精密仪器有限公司, FIC-S100) 读取NC膜上T, C线信号并计算测量值T/(T+C), 并代入标准品拟合曲线计算其浓度值, 如表8所示。

[0113] 表8 浓度值结果

[0114]

	T/(T+C)	浓度值(g/l)
回收样本1	0.694	0.117
回收样本2	0.511	0.598
回收样本3	0.440	0.997

[0115] 根据公式: 回收率 = 回收浓度 ÷ 加入浓度 × 100%, 计算样本的回收率, 如表9 所示。

[0116] 表9 回收率结果

	测定浓度 g/l	加入浓度g/l	回收浓度 g/l	回收率%
[0117] 回收样本1	0.117	--	--	--
回收样本2	0.598	0.4545	0.481	106%
回收样本3	0.997	0.909	0.880	97%

[0118] 平均回收率(%) = (106%+97%) ÷ 2 = 101.5%

[0119] 其中:回收样本2中的加入浓度 = $5 * (0.1 / (0.1+1)) = 0.4545$ (g/l),

[0120] 回收样本3中的加入浓度 = $10 * (0.1 / (0.1+1)) = 0.909$ (g/l)

[0121] 实施案例10:检测临床样本

[0122] 收集50例临床血清样本(西门子特定蛋白分析仪测定IgG4后的样本),用本发明的测试条进行对比测试。测试方法:将荧光微球标记的IgG4单克隆抗体1:1000 稀释至工作浓度,取5u1临床样本加入到100u1的荧光微球标记的IgG4单克隆抗体工作溶液中,混合均匀后取100u1加入到测试条上反应,15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线信号并计算测量值T/(T+C)比值。将其代入拟合的标准品曲线,计算出临床样本的测试浓度值。将测试结果与用西门子特定蛋白分析仪的IgG4试剂盒测试的浓度值进行相关性分析,结果如表10所示。

[0123] 表10 对比测试结果

样本#	西门子结果 (g/l)	本发明结果 (g/l)	样本#	西门子结果 (g/l)	本发明结果 (g/l)
1	0.108	0.148	26	1.89	2.09
2	2.65	3.05	27	7.56	8.56
3	2.18	2.08	28	7.34	7.94
4	3.54	3.04	29	10.51	11.51
5	12.60	11.60	30	5.21	5.41
6	4.32	4.82	31	0.208	0.128
7	1.27	1.87	32	1.65	2.05
8	2.32	2.39	33	1.18	1.08

	9	14.38	15.08	34	2.54	2.04
	10	10.01	11.32	35	11.60	10.60
	11	1.54	1.04	36	5.32	4.87
	12	6.02	5.62	37	2.27	1.87
	13	3.21	2.91	38	1.32	1.39
	14	9.56	9.06	39	1.38	1.68
	15	3.89	4.39	40	9.01	9.32
	16	7.52	8.02	41	6.54	6.04
[0125]	17	3.78	4.28	42	6.02	5.62
	18	4.21	4.78	43	6.21	6.91
	19	0.561	0.461	44	13.56	13.06
	20	0.289	0.389	45	4.89	4.39
	21	2.42	2.89	46	7.52	8.02
	22	6.79	7.79	47	4.78	4.38
	23	0.983	1.083	48	3.21	3.68
	24	0.541	0.501	49	0.561	0.761
	25	1.46	1.65	50	0.589	0.489

[0126] 以西门子特定蛋白分析仪试剂的测试结果作为横坐标，本发明试剂条的测量值为纵坐标绘制标准曲线。两组结果的相关性 $R^2=0.9814$ ，如图3所示。

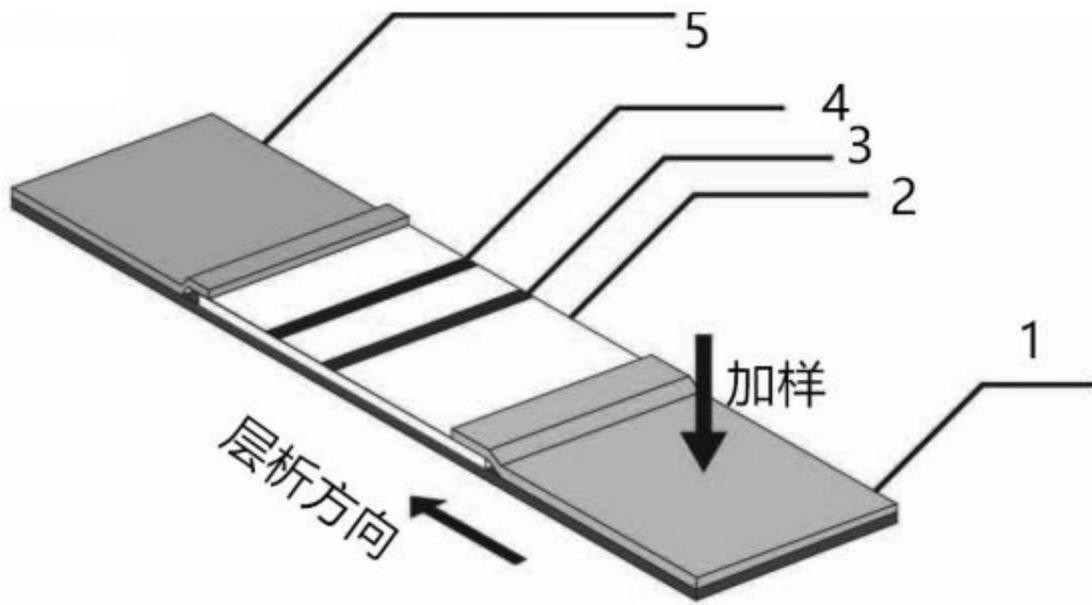


图1

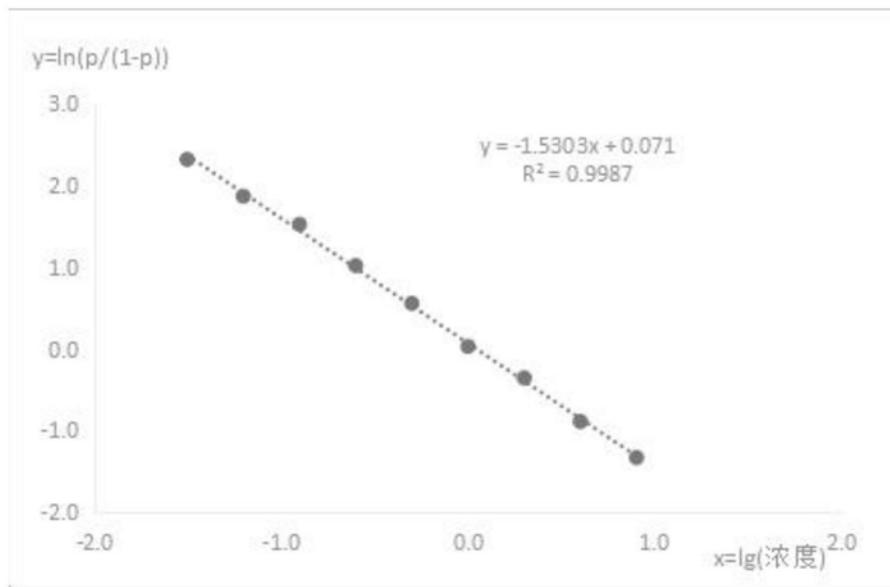


图2

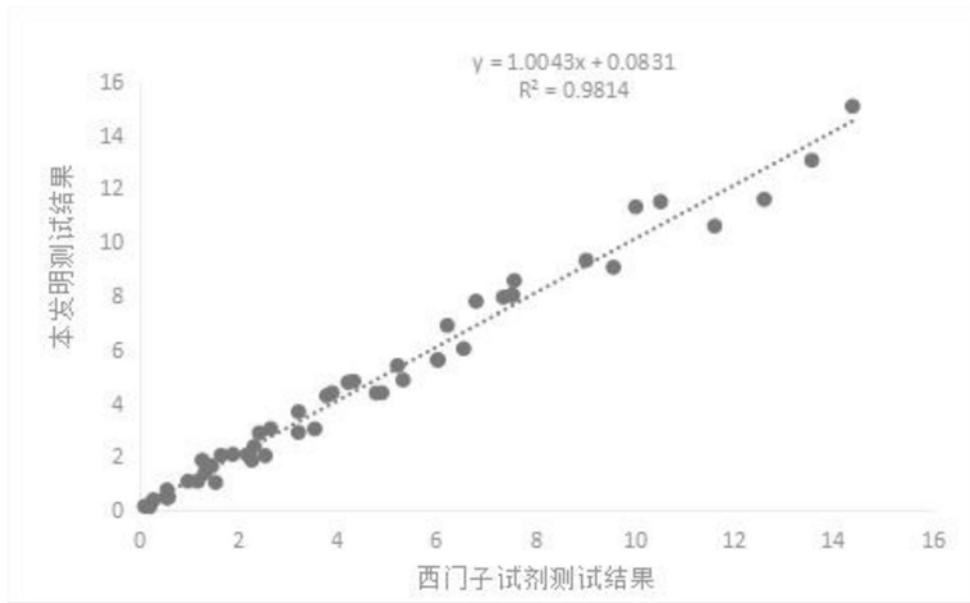


图3

专利名称(译)	一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法		
公开(公告)号	CN109725154A	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201811166782.0	申请日	2018-10-08
[标]发明人	张乐之 余铭恩 胡祥叶 王立童 李丹 吴滨		
发明人	张乐之 余铭恩 胡祥叶 王立童 李丹 吴滨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543		
代理人(译)	龙涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种IgG4荧光免疫层析测定试剂盒和测定方法。试剂盒由荧光微球标记的IgG4单克隆抗体溶液和免疫层析试纸条组成，抗体溶液包含特殊浓度的荧光微球，荧光微球分别是时间分辨荧光微球和量子点荧光微球。免疫层析试纸条包括底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫；硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线；T线上包被IgG4，C线上包被羊抗鼠IgG。本发明提供的测定方法，测定线性范围0.031~8g/L，线性相关系数为0.9987；灵敏度为0.0169g/L；精密度平均为CV<15%；准确度平均回收率为101.5%；与西门子特定蛋白分析仪测定结果高度相关(r=0.9814)。该方法检测IgG4需时短，检测结果准确，操作流程简单，无需大型仪器设备，适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。

