



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110146706 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910450951.1

(22)申请日 2019.05.28

(71)申请人 中生北控生物科技股份有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区超前  
路27号

(72)发明人 张勇

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限  
公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂  
盒及制备方法

(57)摘要

本发明提供一种抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒及制备方法。所述试剂盒为生化分析仪上使用的液体双试剂,其中试剂R1为添加0.1%~5%w/v增敏剂,0.01%~0.5%w/v表面活性剂,0.5%~5%w/v保护剂和0.02%~0.2%w/v防腐剂的缓冲液体系,试剂R2为抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂。本发明提供的试剂盒相较市售ASO试剂盒,具有精密度好、灵敏度高、线性范围宽、特异性强和准确度好等优点,为临床ASO相关疾病的辅助诊断提供重要依据。

1. 抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括试剂R1与R2,其中试剂R1为反应缓冲液,试剂R2为抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂;

所述试剂R1为0.02~0.2M,pH7.0~9.0的缓冲液,所述缓冲液含有0.1~1M NaCl,0.1%~5%w/v增敏剂,0.01%~0.5%w/v表面活性剂,0.5%~5%w/v保护剂和0.02%~0.2%w/v防腐剂;所述缓冲液选自硼酸、Tris、MES、HEPES、PIPES、TES、TAPSO、Bicine、MOPS中的至少一种;

所述试剂R2是通过水溶性碳化二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺使溶血素“O”与羧基化聚苯乙烯胶乳微球发生共价交联制得的抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径大小为70~180nm,优选80~120nm。

3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述增敏剂选自PEG4000、PEG6000、PEG10000、PEG20000中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂选自Tween-20、Span-20、Triton X-100、TX-10、OP-10、ON-870、F68、Brij35、十六烷基氯化铵中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述保护剂选自BSA、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇中的至少一种。

6. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述防腐剂为NaN<sub>3</sub>和/或Proclin-300。

7. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述溶血素“O”为Abgree公司生产的蛋白S7017。

8. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R2的制备方法如下:

1) 胶乳微球的活化:向1mg/ml羧基化聚苯乙烯胶乳微球1~5ml中加入用50mM,pH6.1 MES溶解的0.1~10mg水溶性碳化二亚胺和0.1~10mg N-羟基琥珀酰亚胺,活化10~60min,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.0~8.0的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的胶乳微球溶液;

2) 溶血素“O”蛋白的偶联:将0.2mg溶血素“O”蛋白加入1mg/ml活化的胶乳微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,8000~18000rpm离心30min,收集的沉淀保存于缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml溶血素“O”蛋白标记胶乳微球溶液,即为试剂R2;

其中,所述缓冲液为0.02~0.2M,pH7.0~9.0的缓冲液,所述缓冲液含有0.1~1M NaCl,0.01%~0.5%w/v表面活性剂,0.5%~5%w/v保护剂和0.02%~0.2%w/v防腐剂;所述缓冲液选自硼酸、Tris、MES、HEPES、PIPES、TES、TAPSO、Bicine、MOPS中的至少一种;所述表面活性剂选自Tween-20、Span-20、Triton X-100、TX-10、OP-10、ON-870、F68、Brij35、十六烷基氯化铵中的至少一种;所述保护剂选自BSA、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇中的至少一种;所述防腐剂为NaN<sub>3</sub>和/或Proclin-300。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R1为0.05~0.1M,pH7.7~8.5的Tris缓冲液,所述缓冲液含有0.1~0.4M NaCl,0.5%~2%w/v PEG6000,0.05%~0.2%w/v Triton X-100,1%~5%w/v BSA,0.05%~0.2%w/v

Proclin-300。

10. 根据权利要求1-9任一项所述检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 分别配制试剂R1以及用于配制试剂R2的缓冲液;

(2) 胶乳微球的活化:向1mg/ml羧基化聚苯乙烯胶乳微球1~5ml中加入用50mM, pH6.1 MES溶解的0.1~10mg水溶性碳化二亚胺和0.1~10mg N-羟基琥珀酰亚胺,活化10~60min, 8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.0~8.0的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的胶乳微球溶液;

(3) 溶血素“O”蛋白的偶联:将0.2mg溶血素“O”蛋白加入1mg/ml活化的胶乳微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,8000~18000rpm离心30min,收集的沉淀保存于缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml溶血素“O”蛋白标记胶乳微球溶液,即为试剂R2;

(4) 将试剂R1和试剂R2分装于瓶中,即得抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒。

## 抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,涉及一种抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒及制备方法。

### 背景技术

[0002] 链球菌溶血素“O”是溶血性链球菌的代谢产物之一,是一种含-SH基的蛋白质,能溶解红细胞,极易被氧化,与空气接触可暂时失去溶血能力,形成-SS基但可借助还原剂使其恢复活力,重新具有溶血作用,溶血素“O”具有很强的抗原性。人受链球菌感染后,ASO(抗链球菌溶血素“O”)在链球菌感染7-10天开始升高,急性感染后2-3周达到高峰。Johnson等研究结果表明ASO升高会持续很长时间,83.3%的研究对象大于6个月仍有ASO升高。ASO阳性常见于咽炎,扁桃体炎,肺炎,急性风湿热,风湿性心脏病,链球菌感染相关肾小球肾炎及链球菌感染后关节炎等疾病。

[0003] 抗链球菌溶血素“O”的测定有溶血抑制法和胶乳法两种,Rantz和Randall对Todd法改良的溶血抑制法需对血清作多管稀释,并要抽取、洗涤羊(兔)红细胞等,操作比较繁琐,影响因素较多。Fasth采用反向单向免疫扩散法测定ASO,使被检血清使ASO和琼脂板上的SLO(溶血素“O”)结合,再用还原剂使SLO还原,根据孔周围是否形成溶血环是否存在ASO。这些方法对操作人员要求较高,样本血清容易被细菌污染,且易受血脂等因素影响,造成ASO检测结果不准确。

[0004] 胶乳免疫比浊法操作简便、灵敏度较高,影响因素少,短时间即可准确定量结果。而且不受溶血、脂血、高胆红素血症、高胆固醇血症等因素的影响。故广泛应用于风湿热、急性肾小球肾炎等链球菌性变态反应疾病的辅助诊断。

[0005] CN201510227792.0公开了一种抗链球菌溶血素“O”检测试剂盒,该试剂盒采用化学交联使溶血素“O”与羧化聚苯乙烯胶乳供价交联,形成ASO试剂,该法制备试剂线性范围窄,分析灵敏度低,不利于临床推广使用。

[0006] 目前,国内ASO的检测主要依靠进口试剂,市场上的国产试剂相对较少,并且存在稳定性、分析灵敏度和试剂线性范围较差等问题,影响了临床检测结果的准确度,而进口试剂价格相对高昂,给患者造成沉重的负担,急需一种操作简便、灵敏度高、准确度高、成本低廉的产品。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒及制备方法。

[0008] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒,所述试剂盒包括试剂R1与R2,其中试剂R1为反应缓冲液,试剂R2为抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂;

[0009] 所述试剂R1为0.02~0.2M,pH7.0~9.0的缓冲液,所述缓冲液含有0.1~1M NaCl,

0.1%~5%w/v增敏剂,0.01%~0.5%w/v表面活性剂,0.5%~5%w/v保护剂和0.02%~0.2%w/v防腐剂;所述缓冲液选自硼酸、Tris、MES、HEPES、PIPES、TES、TAPSO、Bicine、MOPS中的至少一种;

[0010] 所述试剂R2是通过水溶性碳化二亚胺(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)使溶血素“O”与羧基化聚苯乙烯胶乳微球发生共价交联制得的抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂。

[0011] 所述羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径大小为70~180nm,优选80~120nm。

[0012] 所述增敏剂选自PEG4000、PEG6000、PEG10000、PEG20000等中的至少一种。

[0013] 所述表面活性剂选自Tween-20、Span-20、Triton X-100、TX-10、OP-10、ON-870、F68、Brij35、十六烷基氯化铵等中的至少一种。

[0014] 所述保护剂选自BSA、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇等中的至少一种。

[0015] 所述防腐剂为NaN<sub>3</sub>和/或Proclin-300。

[0016] 优选地,所述溶血素“O”为Abgree公司生产的蛋白S7017。

[0017] 所述试剂R2的制备方法如下:

[0018] 1) 胶乳微球的活化:向1mg/ml羧基化聚苯乙烯胶乳微球1~5ml中加入用50mM, pH6.1MES溶解的0.1~10mg水溶性碳化二亚胺和0.1~10mg N-羟基琥珀酰亚胺,活化10~60min,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.0~8.0的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的胶乳微球溶液;

[0019] 2) 溶血素“O”蛋白的偶联:将0.2mg溶血素“O”蛋白加入1mg/ml活化的胶乳微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,8000~18000rpm离心30min,收集的沉淀保存于缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml溶血素“O”蛋白标记胶乳微球溶液,即为试剂R2;

[0020] 其中,所述缓冲液为0.02~0.2M, pH7.0~9.0的缓冲液,所述缓冲液含有0.1~1MNaCl,0.1%~5%w/v增敏剂,0.01%~0.5%w/v表面活性剂,0.5%~5%w/v保护剂和0.02%~0.2%w/v防腐剂;所述缓冲液选自硼酸、Tris、MES、HEPES、PIPES、TES、TAPSO、Bicine、MOPS中的至少一种;所述表面活性剂选自Tween-20、Span-20、Triton X-100、TX-10、OP-10、ON-870、F68、Brij35、十六烷基氯化铵中的至少一种;所述保护剂选自BSA、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇中的至少一种;所述防腐剂为NaN<sub>3</sub>和/或Proclin-300。

[0021] 优选地,所述试剂R1为0.05~0.1M, pH7.7~8.5的Tris缓冲液,所述缓冲液含有0.1~0.4M NaCl,0.5%~2%w/v PEG6000,0.05%~0.2%w/v Triton X-100,1%~5%w/v BSA,0.05%~0.2%w/v Proclin-300。

[0022] 第二方面,本发明提供所述抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0023] (1) 分别配制试剂R1以及用于配制试剂R2的缓冲液;

[0024] (2) 胶乳微球的活化:向1mg/ml羧基化聚苯乙烯胶乳微球1~5ml中加入用50mM, pH6.1MES溶解的0.1~10mg水溶性碳化二亚胺和0.1~10mg N-羟基琥珀酰亚胺,活化10~60min,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.0~8.0的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的胶乳微球溶液;

[0025] (3) 溶血素“O”蛋白的偶联:将0.2mg溶血素“O”蛋白加入1mg/ml活化的胶乳微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,8000~18000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM

PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,8000~18000rpm离心30min,收集的沉淀保存于缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml溶血素“O”蛋白标记胶乳微球溶液,即为试剂R2;

[0026] (4) 将试剂R1和试剂R2分装于瓶中,即得抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒。

[0027] 在本发明的一个具体实施方式中,所述抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒的制备如下:

[0028] 1、溶液的配制

[0029] 活化液的配制:称量10.66g活化剂MES于烧杯中,加入纯化水1L,搅拌混匀后,用NaOH溶液调pH至6.1,4℃保存备用。

[0030] 偶联液PBS的配制:称量2.865g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 于烧杯中,依次称取0.272g的 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、7.948g的NaCl和1.983g的KCl加入上述烧杯中,用1L纯化水定容,搅拌混匀后,调pH至7.4,4℃保存备用。

[0031] R1缓冲液(试剂R1)的配制:配制0.1M的Tris缓冲液,pH8.0,含有0.2M的NaCl,1% (w/v) PEG6000,0.05% (w/v) Triton X-100,1% (w/v) BSA,0.1% (w/v) Proclin-300,4℃保存备用。

[0032] R2缓冲液的配制:配制0.1M的Tris缓冲液,pH8.0,含有0.2M的NaCl,0.05% (w/v) Triton X-100,1% (w/v) BSA,0.1% (w/v) Proclin-300,4℃保存备用。

[0033] 2、胶乳微球标记蛋白

[0034] (1) 微球活化:向1mg/ml羧基化聚苯乙烯胶乳微球(购自JSR公司,商品编号P0115) 1ml中加入用50mM, pH6.1MES溶解的1mg EDC和10mg NHS,活化30min,14000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.4的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的胶乳微球溶液。

[0035] (2) 溶血素“O”蛋白的偶联:将0.2mg SLO蛋白(Abgree公司S7017)加入1mg/ml活化的胶乳微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,14000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,14000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH8.0的R2缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml的SLO蛋白标记胶乳微球溶液,即为试剂R2。

[0036] 3、胶乳试剂盒的制备

[0037] 将上述制备的溶液,以试剂R1:40ml,试剂R2:60ml的规格分装在70ml塑料瓶中,即为抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒(ASO胶乳试剂盒)。

[0038] 本发明检测试剂盒的检测原理:将溶血素“O”交联于胶乳微球上,与待测血清中ASO抗体发生抗原-抗体反应,引起微球凝集,形成一定的浊度,在570nm波长下,通过与同样处理的校准品对照,测定出样品中ASO抗体的含量。

[0039] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0040] (一) 本发明提供的ASO胶乳试剂盒,检测快速、线性范围宽、准确度好。检测下限可达20IU/mL,线性范围为20~1500IU/mL,为临床的准确诊断提供依据。

[0041] (二) 利用本发明提供的ASO胶乳试剂盒,由于增敏剂和表面活性剂的协同作用,使所制备的试剂盒具有较好的精密性:批内CV $\leq$ 3%;批间CV $\leq$ 4%,确保单次测量结果的重复性和准确性。。

## 附图说明

[0042] 图1为本发明实施例3中抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒的线性范围。

## 具体实施方式

[0043] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0044] 以下实施例中使用的羧基化聚苯乙烯微球的平均粒径大小为100nm,购自JSR公司,商品编号P0115。

[0045] 实施例1抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒的制备方法

[0046] 本实施例提供的试剂盒基于胶乳免疫比浊法,包含液体双试剂(试剂R1和试剂R2)。其中,试剂R1为稀释液(反应缓冲液),试剂R2为含有ASO胶乳微球的溶液(抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂),其特点在于应用化学交联法,通过水溶性碳化二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺使溶血素“O”与羧基聚苯乙烯胶乳微球偶联,制备ASO胶乳试剂。所述试剂盒的制备方法具体如下:

[0047] 1、溶液的配制

[0048] 活化液的配制:称量10.66g活化剂MES于烧杯中,加入纯化水1L,搅拌混匀后,用NaOH溶液调pH至6.1,4℃保存备用。

[0049] 偶联液PBS的配制:称量2.865g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 于烧杯中,依次称取0.272g的 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、7.948g的NaCl和1.983g的KCl加入上述烧杯中,用1L纯化水定容,搅拌混匀后,调pH至7.4,4℃保存备用。

[0050] R1缓冲液(试剂R1)的配制:配制0.1M的Tris缓冲液,pH8.0,含有0.2M的NaCl,1% (w/v) PEG6000,0.05% (w/v) Triton X-100,1% (w/v) BSA,0.1% (w/v) Proclin-300,4℃保存备用。

[0051] R2缓冲液的配制:配制0.1M的Tris缓冲液,pH8.0,含有0.2M的NaCl,0.05% (w/v) Triton X-100,1% (w/v) BSA,0.1% (w/v) Proclin-300,4℃保存备用。

[0052] 2、胶乳微球标记蛋白

[0053] (1) 微球活化:向1mg/ml羧基化聚苯乙烯胶乳微球1ml中加入用50mM, pH6.1MES溶解的1mg EDC和10mg NHS,活化30min,14000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.4的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的胶乳微球溶液。

[0054] (2) 溶血素“O”蛋白的偶联:将0.2mg SLO蛋白(Abgree公司S7017)加入1mg/ml活化的胶乳微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,14000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,14000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH8.0的R2缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml的SLO蛋白标记胶乳微球溶液,即为试剂R2。

[0055] 3、胶乳试剂盒的制备

[0056] 将上述制备的溶液,以试剂R1:40ml,试剂R2:60ml的规格分装在70ml塑料瓶中,即为抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒(ASO胶乳试剂盒)。

[0057] 实施例2抗链球菌溶血素“O”检测试剂盒的应用

[0058] 1、适用仪器:HITACHI 7180、OLYMPUS AU400及TOSHIBA 40FR全自动生化分析仪。

[0059] 2、待测样本：临床标准方法收集的血清，2-8℃可稳定保存一周。

[0060] 3、具体检测程序见表1。

[0061] 表1

[0062]

比色杯中加入	空白管	校准管	样品管
试剂R1 (μl)	100	100	100
蒸馏水 (μl)	3	-	-
校准品 (μl)	-	3	-

[0063]

样品 (μl)	-	-	3
试剂R2 (μl)	170	170	170
分别混匀，在37℃孵育0.5-1.5分钟和4-5分钟时，分别读取570nm吸光度A1和A2，计算 $\Delta A = (A2 - A1)$ 。			

[0064] 校准品的成分如下：50mM PBS缓冲液作为溶剂配制的含1%BSA、0.1%Proclin-300和500IU/mL抗链球菌溶血素“O”的校准品溶液。

[0065] 4、计算结果：样品中ASO的浓度 (IU/mL) =  $\Delta AT / \Delta AS \times$  校准液浓度

[0066] 式中： $\Delta AT$ 以空白管吸光度为对照的样品管吸光度。

[0067]  $\Delta AS$ 以空白管吸光度为对照的校准管吸光度。

[0068] 5、参考值范围：ASO ≤ 195IU/mL。

[0069] 6、分析灵敏度：500IU/mL的吸光度0.2000-0.4000A。

[0070] 7、精密度：批内CV ≤ 3%；批间CV ≤ 4%。

[0071] 8、稳定性：2~8℃密封避光贮存18个月。

[0072] 9、准确度：加标回收率为90%~110%。

[0073] 实施例3抗链球菌溶血素“O”检测试剂盒线性检测范围测试

[0074] 将浓度为1500IU/mL的ASO样本对比稀释成梯度浓度，用本试剂盒对每个浓度重复测定3次，取平均值，与理论值计算线性相关系数，检测结果如表2所示，线性相关性如图1所示。

[0075] 表2 ASO梯度浓度检测结果



[0076]

理论浓度 (IU/mL)	测定值1 (IU/mL)	测定值2 (IU/mL)	测定值3 (IU/mL)	测定均值 (IU/mL)	相对偏差	绝对偏差
23	21.4	21.8	20.6	21.3	-9.26%	-2.2
47	42.0	45.6	43.9	43.8	-6.49%	-3.0
94	92.1	94.7	95.1	93.9	0.20%	0.2
188	182.1	189.5	190.1	187.2	-0.15%	-0.3
375	389.2	368.9	387.2	381.8	1.80%	6.8
750	738.4	747.8	740.4	742.2	-1.04%	-7.8
1500	1527.0	1529.0	1535.0	1530.3	2.02%	30.3

[0077] 图1对应的线性相关方程为： $y=1.0183x-4.3588$ ，相关系数 $R^2=0.9998$ ，结果表明本试剂盒线性检测范围为20~1500IU/mL，检测下限可达20IU/mL。

[0078] 实施例4血清样本测试

[0079] 将本试剂盒与日本生研株式会社公司的AS0胶乳试剂进行样本比对测试，表3测定结果相关系数 $r^2$ 为0.9907，相关性良好，可用于临床诊断使用。

[0080] 表3 AS0临床样本比对结果

[0081]

样本编号	本试剂测值 (IU/mL)	生研测值 (IU/mL)	样本编号	本试剂测值 (IU/mL)	生研测值 (IU/mL)
1	54.5	55.4	16	256.7	278.8
2	33.0	31.9	17	345.8	324.2
3	250.6	222.7	18	388.4	387.7
4	593.5	583.5	19	508.0	508.6
5	255.9	278.6	20	41.1	38.6
6	304.6	315.7	21	54.3	59.1
7	234.8	223.3	22	216.7	217.5
8	124.5	110.5	23	163.9	160.1
9	129.6	123.5	24	252.2	242
10	103.5	101.5	25	103.2	102.9
11	283.9	302.8	26	317.4	289.3
12	45.0	42.6	27	111.8	102.5
13	51.9	50.2	28	79.9	73.6
14	37.5	40.3	29	302.2	327.8
15	433.4	428.5	30	447.1	404.7

[0082] 实施例5试剂组分优化实验

[0083] 按照实施例1方法制备AS0胶乳试剂,对试剂R2中各组分含量进行优化,共得到8组配方(表4),将这8组配方R2与R1组成AS0试剂,放置于37℃恒温箱保存,按照试剂盒说明书操作,检测同一样本,观察不同配方试剂在37℃保存1天、3天、5天、7天的稳定性情况,结果如表5所示。分析数据得出最优保护剂组分。

[0084] R1缓冲液(试剂R1)的配制:配制0.1M的Tris缓冲液,pH8.0,含有0.2M的NaCl,1% (w/v) PEG6000,0.05% (w/v) Triton X-100,1% (w/v) BSA,0.1% (w/v) Proclin-300,4℃保存备用。

[0085] 表4试剂R2组分优化实验

[0086]

组分编号	Tris (mol/L)	NaCl (mol/L)	Triton X-100 (w/v)	BSA (w/v)	Proclin-300 (w/v)
1	0.05	0.1	0.05%	1%	0.1%
2	0.05	0.1	0.1%	2%	0.1%
3	0.05	0.2	0.05%	1%	0.1%
4	0.05	0.2	0.1%	2%	0.1%

[0087]

5	0.1	0.1	0.05%	1%	0.1%
6	0.1	0.1	0.1%	2%	0.1%
7	0.1	0.2	0.05%	1%	0.1%
8	0.1	0.2	0.1%	2%	0.1%

[0088] 表5 37℃保存条件下不同组分稳定性分析结果

[0089]

放置时间	组分编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 天	2.96%	3.22%	2.89%	3.57%	3.69%	3.69%	2.48%	5.26%
3 天	5.56%	3.56%	3.73%	4.16%	4.65%	5.13%	3.15%	4.36%
5 天	4.53%	5.13%	5.55%	6.18%	7.39%	7.10%	3.94%	5.21%
7 天	6.37%	5.78%	5.46%	5.49%	6.00%	6.75%	4.73%	6.62%

[0090] 表5结果表明,不同组配方配制的ASO试剂在37℃保存条件下,对同一样本测值变化较小,稳定性良好,其中组分7在7天内测值变化最小,作为最优配方。

[0091] 对比例:

[0092] 将本发明试剂盒1(实施例1制备)与CN201510227792.0中制备的试剂盒2(试剂R1:乙二酸四乙酸二钠5mmol/L,氯化钠100mmol/L,Tris缓冲液15mmol/L;试剂R2:氯化钠100mmol/L,ASO胶乳试剂400ml/L)在同一HITACHI7180全自动生化分析仪下,进行灵敏度,线性范围,精密度实验,结果如下。

[0093] (1) 灵敏度检测结果见表6:

[0094] 表6灵敏度检测结果比较

[0095]

项目	本发明试剂盒1	CN201510227792.0试剂盒2
500IU/mL分析灵敏度	0.2875	0.1253

[0096] 本发明试剂盒1灵敏度优于专利方法制备试剂盒2。

[0097] (2) 线性范围检测结果见表7:

[0098] 表7线性范围检测结果比较

[0099]

理论浓度 (IU/mL)	本发明试剂盒 1 测值	本发明试剂盒 1 测值相对偏差	CN201510227792.0 试剂盒 2 测值	CN201510227792.0 试剂盒 2 测值相对偏差
23	21.5	-8.27%	18.0	-23.20%
47	44.8	-4.43%	42.9	-8.48%
94	97.2	3.68%	99.2	5.81%
188	192.5	2.64%	214.0	14.13%
375	385.9	2.91%	430.0	14.67%
750	758.5	1.13%	722.5	-3.67%
1500	1529.0	1.93%	1137.0	-24.20%

[0100] 结果表明,本发明试剂盒线性范围为20-1500IU/mL,CN201510227792.试剂盒2检测范围无法达到高值1500IU/mL,本发明试剂盒线性检测范围更优。

[0101] (3)精密度实验结果见表8:

[0102] 表8精密度实验结果比较

[0103]

样本测试	本发明试剂盒 1 测值 (IU/mL)	CN201510227792. 试剂盒 2 测值 (IU/mL)
1	105.7	101.5
2	103.7	113.2
3	105.1	122.3
4	109.4	108.4
5	105.6	117.9
6	102.5	111.6
7	103.5	122.3
8	102.5	101.1
9	103.0	112.4
10	100.4	110.2
均值	104.1	112.1
SD	2.459	7.411
CV	2.36%	6.61%

[0104] 结果表明,本发明试剂盒测试同一份样品的精密度CV值,相比CN201510227792.试剂盒2更优。

[0105] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

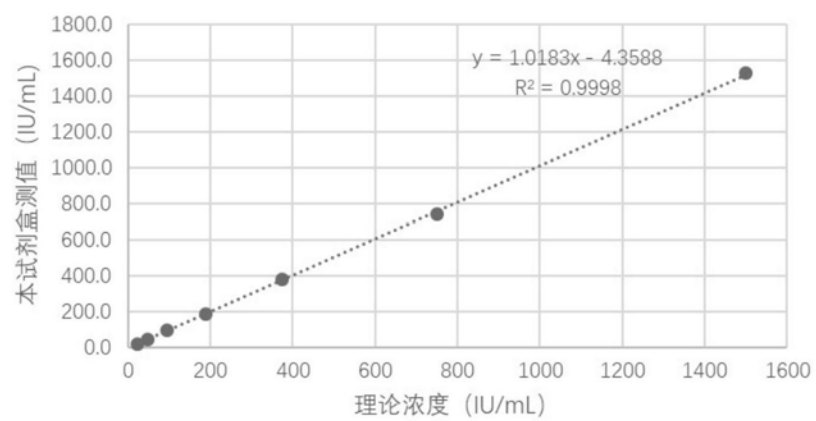


图1

专利名称(译)	抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110146706A</a>	公开(公告)日	2019-08-20
申请号	CN201910450951.1	申请日	2019-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
[标]发明人	张勇		
发明人	张勇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/544 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/544 G01N33/68 G01N2333/47		
代理人(译)	王文君 黄爽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种抗链球菌溶血素“O”胶乳免疫比浊检测试剂盒及制备方法。所述试剂盒为生化分析仪上使用的液体双试剂，其中试剂R1为添加0.1%~5%w/v增敏剂，0.01%~0.5%w/v表面活性剂，0.5%~5%w/v保护剂和0.02%~0.2%w/v防腐剂的缓冲液体系，试剂R2为抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂。本发明提供的试剂盒相较于市售ASO试剂盒，具有精密度好、灵敏度高、线性范围宽、特异性强和准确度好等优点，为临床ASO相关疾病的辅助诊断提供重要依据。

比色杯中加入	空白管	校准管	样品管
试剂R1 (μl)	100	100	100
蒸馏水 (μl)	3	.	.
校准品 (μl)	.	3	.