



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106153887 A

(43)申请公布日 2016.11.23

(21)申请号 201610359609.7

(22)申请日 2016.05.27

(71)申请人 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司

地址 230000 安徽省合肥市包河工业区大连路与北京路交叉口西南角合肥华云印务有限公司综合东楼一至五层

(72)发明人 蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运

(74)专利代理机构 杭州君度专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33240

代理人 王桂名

(51)Int.Cl.

G01N 33/541(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及医学及生物化学技术领域,具体来说是一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒。本发明的目的在于解决现有技术中抗链球菌溶血素“O”检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题。本发明为解决上述技术问题采用彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,在试剂R1液中添加了聚乙二醇-2000,能够加速反应;在试剂R2中采用乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体,对抗链球菌溶血素“O”的检测灵敏度更高,检测准确性更好,因此检测准确度高,另外检测也比较方便。

1. 一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2,其特征在于:所述的彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
聚乙二醇-2000	5~25 g/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L
EDTA	20~70 mmol/L
海藻糖	20~50 mmol/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L
甘油	5~25 mmol/L
乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体	0.2~2 %

其溶剂为纯化水。

2. 一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒,其特征在于:包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris缓冲液	60 mmol/L
聚乙二醇-2000	15 g/L
Proclin-300	1.5g/L
EDTA	45 mmol/L
海藻糖	35 mmol/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

Tris缓冲液	60 mmol/L
Proclin-300	1.5 g/L
甘油	15 mmol/L
乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体	1.1 %

其溶剂为纯化水。

3. 根据权利要求1所述的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒,其特征在于:所述的乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体为含有能与抗链球菌溶血素“O”抗体特异性结合的Fab功能部位的完整抗体或抗体片段。

4. 根据权利要求1所述的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒,其特征在于:所述的包被抗链球菌溶血素“O”抗体的粒径在40~500nm之间。

5. 根据权利要求1所述的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒的制备方法和使用方法,其特征在于:包括以下步骤:

(a)按照下列组分含量配制好R1试剂:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
---------	---------------

聚乙二醇-2000	5~25 g/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L
EDTA	20~70 mmol/L
海藻糖	20~50 mmol/L

其溶剂为纯化水；

(b)按照下列组分含量配制好R2试剂：

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L
甘油	5~25 mmol/L
包被抗链球菌溶血素“O”抗体	0.2~2 %

其溶剂为纯化水；

(c)将待测样本与试剂R1和试剂R2混合，使其充分反应；

(d)用全自动生化分析仪测定反应后的吸光度差值；

(e)根据吸光度变化值计算出样本中的抗链球菌溶血素“O”的值。

6. 根据权利要求1所述的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒，其特征在于：所述的乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体制备步骤如下：

(a)将粒径为120nm的胶乳颗粒，用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到1%，每mL溶液中加入EDAC 0.5 mg，室温反应2小时，在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟，去上清，将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中，超声分散；

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟，弃上清，将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中，使得胶乳颗粒最终浓度为2%，超声分散，边搅拌边加入等体积的含抗链球菌溶血素“O”抗体的MES稀释液，混合搅拌，室温反应2小时；

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟，弃上清，沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散，加入BSA，4℃封闭过夜；离心去上清，用步骤(b)制得的分散液溶解胶乳颗粒，使胶乳颗粒终浓度为1.1%，超声分散，制得乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体。

7. 根据权利要求5所述的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒的制备方法和使用方法，其特征在于：步骤(c)中，所述的试剂R1与试剂R2的体积比为4:1。

8. 根据权利要求5所述的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒的制备方法和使用方法，其特征在于：步骤(c)中，所述的待测样本与试剂R1和试剂R2的总体积的体积比在1:20到1:70之间。

一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学及生物化学技术领域,具体来说是一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒。

背景技术

[0002] 抗链球菌溶血素“O”,简称抗“O”或ASO,是A群链球菌产生的一种外毒素,能溶解红细胞,并对机体多种细胞有毒性作用。人体感染溶血性链球菌后,血清中可出现大量抗链球菌溶血素“O”抗体。检测抗链球菌溶血素“O”可作为链球菌感染后变态反应性疾病的辅助诊断。

[0003] 人体感染了A组溶血性链球菌后,“O”溶血素在体内作为一种抗原物质存在。为了测定这种能中和链球菌溶血素“O”的抗体含量,就称为抗链球菌溶血素“O”试验。抗“O”的数值以单位计算,有100、125、166、250、333、500、625、833、1250、2500等数档。正常人一般在500单位以下,若高于500单位,说明最近有过溶血性链球菌感染。有些病人抗“O”升高,但是没有关节酸痛等症状,不能认为就是患了风湿关节炎,只能说明近期曾有过溶血性链球菌感染,患了扁桃体炎、咽炎、猩红热等一类疾病。但是,风湿性关节炎的发病原因确实与链球菌的感染有关,所以,风湿性关节炎活动期,抗“O”是会升高的。

[0004] 据研究,柯萨奇B病毒、高胆固醇血症、溶血、肝炎、肾病综合症等疾病,均可呈现非特异性的抗“O”增高,但是滴度不是很高,类风湿关节炎也是如此。一般认为,类风湿关节炎的发病可能与某些微生物的感染有关,感染后引起异常免疫反应。链球菌也可能混杂在其中,部分参与了感染,因而出现了抗“O”。另外,类风湿关节炎病人“久病体虚”,抵抗力较差,容易收到链球菌的侵袭,我们在临床上常见到类风湿关节炎病人患有咽炎。还有部分关节炎病人应用肾上腺皮质激素或免疫抑制剂治疗之后,抗感染能力明显下降,这也是合并链球菌感染的原因。

[0005] 目前测定抗链球菌溶血素“O”的方法主要为酶联免疫法。但酶联免疫吸附法测定耗时长,操作复杂,对操作者有较高的专业技能要求,且只能定性或者半定量检测。胶乳凝集实验只可定性检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于解决现有技术中抗链球菌溶血素“O”检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,提供一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒。

[0007] 本发明解决上述技术问题提供的技术方案是:一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
聚乙二醇-2000	5~25 g/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L

EDTA	20~70 mmol/L
海藻糖	20~50 mmol/L
其溶剂为纯化水。	

[0008] 试剂R2:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L
甘油	5~25 mmol/L
乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体	0.2~2 %
其溶剂为纯化水。	

[0009] 作为优选,本试剂盒中独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris缓冲液	60 mmol/L
聚乙二醇-2000	15 g/L
Proclin-300	1.5g/L
EDTA	45 mmol/L
海藻糖	35 mmol/L

其溶剂为纯化水。

[0010] 试剂R2:

Tris缓冲液	60 mmol/L
Proclin-300	1.5 g/L
甘油	15 mmol/L
乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体	1.1 %

其溶剂为纯化水。

[0011] 作为优选,所述的乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体为含有能与抗链球菌溶血素“O”抗体特异性结合的Fab功能部位的完整抗体或抗体片段。

[0012] 作为优选,所述的包被抗链球菌溶血素“O”抗体的粒径在40~500nm之间。

[0013] 作为优选,该测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒的制备方法和使用方法包括以下步骤:

(a)按照下列组分含量配制好R1试剂:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
聚乙二醇-2000	5~25 g/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L
EDTA	20~70 mmol/L
海藻糖	20~50 mmol/L

其溶剂为纯化水。

[0014] (b)按照下列组分含量配制好R2试剂:

Tris缓冲液	20~100 mmol/L
Proclin-300	0.5~2.5 g/L

甘油 5~25 mmol/L
 包被抗链球菌溶血素“O”抗体 0.2~2 %
 其溶剂为纯化水。

[0015] (c)将待测样本与试剂R1和试剂R2混合,使其充分反应进一步优选的,试剂R1与试剂R2的体积比为4:1,待测样本与试剂R1和试剂R2的总体积的体积比在1:20到1:70之间。

[0016] (d)用全自动生化分析仪测定反应后的吸光度差值;

(e)根据吸光度变化值计算出样本中的抗链球菌溶血素“O”的值。

[0017] 作为优选,所述的乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体制备步骤如下:

(a)将粒径为120nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到1%,每mL溶液中加入EDAC 0.5 mg,室温反应2小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为2%,超声分散,边搅拌边加入等体积的含抗链球菌溶血素“O”抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,用步骤(b)制得的分散液溶解胶乳颗粒,使胶乳颗粒终浓度为1.1%,超声分散,制得乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体。

[0018] 本发明所采用的胶乳增强免疫比浊法的反应原理是抗原抗体反应:样品中抗链球菌溶血素“O”(ASO)可与试剂中乳胶包被抗链球菌溶血素“O”乳胶结合发生凝集反应,产生一定浊度。该浊度高低ASO的含量成正比。在一定波长下测定浊度并通过多点定标曲线可进行抗链球菌溶血素“O”的定量测定。

[0019] 样本中抗链球菌溶血素“O”(ASO)的活性(U/mL) = $C_s \times \frac{\Delta A_r}{\Delta A_s}$ (U/mL)

式中: ΔA_r 以空白管吸光度作对照的样品管吸光度值

ΔA_s 以空白管吸光度作对照的校准管吸光度值

C_s 校准液中ASO的浓度

与现有技术相比,本发明具有以下有益优点:本发明在试剂R1液中添加了聚乙二醇-2000,能够加速反应;在试剂R2中采用乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体,对抗链球菌溶血素“O”的检测灵敏度更高,检测准确性更好,因此检测准确度高,另外检测也比较方便。

[0020] 附图说明:

图1为本试剂盒与化学发光法的检测结果对比。

具体实施方式

[0021] 以下结合具体实施例进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。

[0022] 实施例1

本发明的试剂盒包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,其中试剂R1:

Tris缓冲液 60 mmol/L

聚乙二醇-2000	15 g/L
Proclin-300	1.5g/L
EDTA	45 mmol/L
海藻糖	35 mmol/L
其溶剂为纯化水。	

[0023] 试剂R2:

Tris缓冲液	60 mmol/L
Proclin-300	1.5 g/L
甘油	15 mmol/L
乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体	1.1 %
其溶剂为纯化水。	

[0024] 实施例2

试剂盒的制备和使用方法

1、乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体的制备:

(a)将粒径为120nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到1%,每mL溶液中加入EDAC 0.5 mg,室温反应2小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为2%,超声分散,边搅拌边加入等体积的含抗链球菌溶血素“O”抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,用步骤(b)制得的分散液溶解胶乳颗粒,使胶乳颗粒终浓度为1.1%,超声分散,制得乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体。

[0025] 2、按照下列组分含量配制好试剂:

(a)按照下列组分含量配制好R1试剂:

Tris缓冲液	60 mmol/L
聚乙二醇-2000	15 g/L
Proclin-300	1.5g/L
EDTA	45 mmol/L
海藻糖	35 mmol/L
其溶剂为纯化水。	

[0026]

(b)按照下列组分含量配制好R2试剂:

Tris缓冲液	60 mmol/L
Proclin-300	1.5 g/L
甘油	15 mmol/L
乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体	1.1 %
其溶剂为纯化水。	

[0027] 3、全自动生化分析仪参数设置

(a)检测温度:37℃;

(b)检测波长:主波长600nm;

(c)反应时间 :10min,其中,孵育时间 5min,加入试剂 R2 后立即测定读取吸光度 A1,5min后读取吸光度 A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$;

(d) 反应方向:正反应;

4、检测步骤

(a)取200 μ l试剂R1与4 μ l待测样本混匀;

(b)将混匀后的溶液在37℃的条件下孵育5min;

(c)加入50 μ l试剂R2,立即测定读取吸光度A1,5min后读取吸光度A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$;

(d) 样本中抗链球菌溶血素“O”(ASO)的活性(U/mL)= $C_s \times \frac{\Delta A_r}{\Delta A_s}$ (U/mL),计算出样本中的抗链球菌溶血素“O”的活度。

[0028] 参照附图1,附图1为用实施例1所制得的一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒多次测定不同样本中抗链球菌溶血素“O”的测定结果,以及在同等条件下与化学发光法测定结果的对比分析。从相关性实验结果可见,本试剂盒与化学发光检测结果相关性很好,相关方程 $y=0.9854x+0.5203$, $R^2=0.9906$,从结果可以看出本试剂盒结果准确性可靠,相关性良好,可以应用于抗链球菌溶血素“O”的检测。

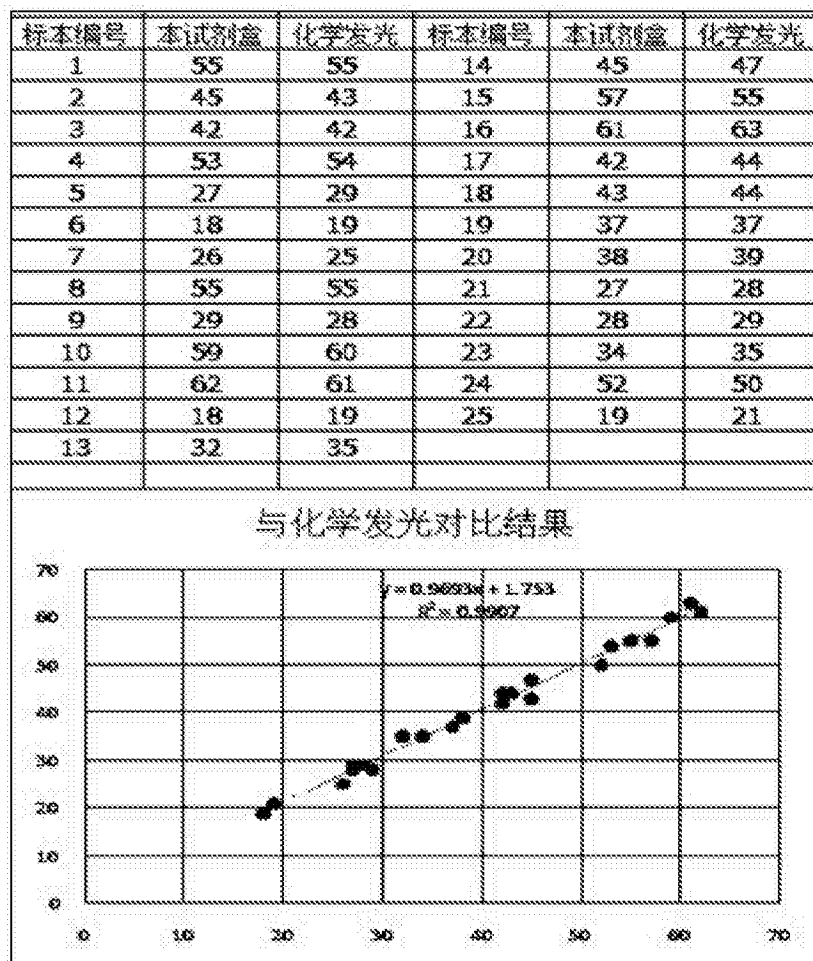


图1

专利名称(译)	一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒		
公开(公告)号	CN106153887A	公开(公告)日	2016-11-23
申请号	CN201610359609.7	申请日	2016-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运		
发明人	蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运		
IPC分类号	G01N33/541 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/541		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学及生物化学技术领域，具体来说是一种测定抗链球菌溶血素“O”的试剂盒。本发明的目的在于解决现有技术中抗链球菌溶血素“O”检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题。本发明为解决上述技术问题采用彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分，在试剂R1液中添加聚乙二醇-2000，能够加速反应；在试剂R2中采用乳胶包被抗链球菌溶血素“O”抗体，对抗链球菌溶血素“O”的检测灵敏度更高，检测准确性更好，因此检测准确度高，另外检测也比较方便。

