



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108490166 A

(43)申请公布日 2018.09.04

(21)申请号 201810170146.9

(22)申请日 2018.02.28

(71)申请人 广州市丰华生物工程有限公司  
地址 510000 广东省广州市经济技术开发区银谊街6号

(72)发明人 谭玉华 刘灿 赵凡一 毛静宜

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202  
代理人 宋静娜 郝传鑫

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

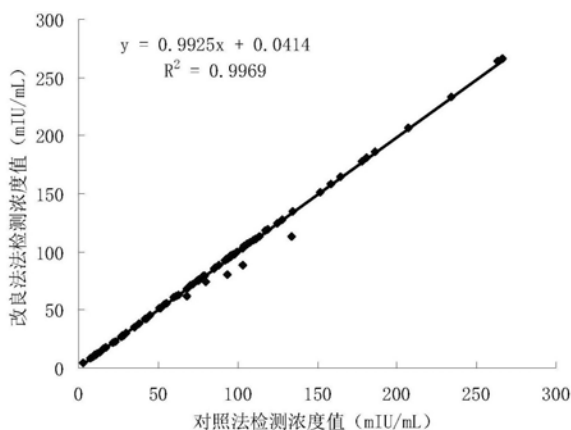
权利要求书1页 说明书22页 附图2页

(54)发明名称

一种改良实验缓冲液及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种改良实验缓冲液,包含以下组分:基础实验缓冲液、氯化钠和解离剂;所述解离剂选自8-苯胺基萘-1-磺酸盐、柳硫汞、水杨酸钠和三氯醋酸钠中的至少一种。同时,本发明还公开了所述改良实验缓冲液的应用。本发明提供的改良实验缓冲液可有效降低静电力,促进非特异性免疫反应或非特异吸附的低亲和力蛋白质配体发生溶解解离,降低了抗原抗体的非特异性结合,同时在解离剂的作用下可促进发生非特异性免疫反应或非特异吸附的蛋白质配体解离,从而降低免疫分析非特异性反应,提高了检测分辨率、准确性和精密度。



1. 一种改良实验缓冲液,其特征在于,包含以下组分:基础实验缓冲液、氯化钠和解离剂;所述解离剂选自8-苯胺基萘-1-磺酸盐、柳硫汞、水杨酸钠和三氯醋酸钠中的至少一种。

2. 根据权利要求1所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述基础实验缓冲液为pH6.0~9.0的Tris-HCl缓冲液、PB缓冲液、MOPS缓冲液或巴比妥缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述改良实验缓冲液中氯化钠的质量体积比为1.60%~10.00%;优选为1.60%~3.40%;更优选为2.55%。

4. 根据权利要求1所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述解离剂在改良实验缓冲液中的质量体积比分别为:8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.005%~0.2%、柳硫汞0.005‰~0.05‰、水杨酸钠0.02%~0.5%和三氯醋酸钠0.05%~0.5%。

5. 根据权利要求4所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述解离剂在改良实验缓冲液中的质量体积比分别为:8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.02%~0.1%、柳硫汞0.01‰~0.03‰、水杨酸钠0.05%~0.3%和三氯醋酸钠0.1%~0.3%。

6. 根据权利要求5所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述解离剂在改良实验缓冲液中的质量体积比分别为:8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.08%、柳硫汞0.02‰、水杨酸钠0.2%和三氯醋酸钠0.2%。

7. 根据权利要求1所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述改良实验缓冲液还可以包含以下组分:动物血清、动物蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和防腐剂;所述动物血清选自小牛血清、鼠血清、羊血清和马血清中的至少一种;所述动物蛋白选自酪蛋白、牛IgG、牛血清白蛋白和胰蛋白胨中的至少一种。

8. 根据权利要求7所述的改良实验缓冲液,其特征在于,所述改良实验缓冲液中动物血清的体积比为10%;动物蛋白的质量体积比为0.20%;Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%;防腐剂的体积比为0.10%。

9. 根据权利要求1~8任一项所述的改良实验缓冲液在基于抗原抗体结合的免疫分析法中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述基于抗原抗体结合的免疫分析法为双抗原夹心免疫分析法或双抗体夹心免疫分析法。

## 一种改良实验缓冲液及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物学检测技术领域,具体涉及一种改良实验缓冲液及其应用。

### 背景技术

[0002] 免疫分析法是利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法,具有灵敏度高、特异性强、快速和低成本的优点;可对大量的样品进行常规分析;能够用于样品的定性筛选,也能够对样品进行定量测定以确定样品中待测组分的含量。标记免疫分析是采用荧光素、同位素或酶等示踪物质标记抗体(或抗原)进行抗原-抗体反应,通过对免疫复合物中的标记物的测定,达到对免疫反应进行监测的目的。标记免疫技术主要类型:放射免疫技术、酶免疫技术、荧光免疫技术、化学发光免疫技术等。目前双抗夹心免疫分析法包括双抗原夹心免疫分析法和双抗体夹心免疫分析法,被广泛应用于抗体或抗原检测,双抗原夹心免疫分析法反应模式是用特异性抗原进行包被和制备标记物,以检测相应的抗体。双抗体夹心法原理类似,用特异性抗体进行包被和制备标记物,以检测相应的抗原。双抗原夹心法与间接法测抗体的不同之处为标记物为标抗原代替标抗抗体。双抗夹心法中受检标本不需稀释,可直接用于测定,因此其敏感度相对高于间接法。双抗原夹心法所用到的抗原一般为天然抗原、基因工程重组抗原或人工合成多肽。双抗体夹心法所用到的抗体一般为天然抗体、多克隆抗体和单克隆抗体。但在双抗夹心免疫分析法的应用过程中,发现了越来越多的假阳性现象,出现了一些难以解释的结果,为检验结果的判定、疾病诊断带来了困扰,因此免疫分析法的非特异性反应在检验分析工作中越来越得到重视。

[0003] 产生非特异性的因素较多,如原材料抗原抗体纯化的不纯,基因工程法制备的融合蛋白,所包含的来自表达载体大肠埃希菌等的一些序列可与血清中抗大肠埃希菌的因子发生反应而产生假阳性结果;在合成肽制备过程中,如果某些肽序列错误,会导致合成肽特异性改变而产生假阳性;为使小分子基因工程抗原较好地吸附在微孔上,常使用人血清白蛋白作为桥联接,当人体中针对人血清白蛋白抗原位点产生的抗体或干扰蛋白,可能会产生假阳性。一些血液透析、输血、器官移植、免疫接种、吸毒或其他疾病(肿瘤、自身免疫性疾病、病毒或细菌感染、类风湿性、免疫缺陷疾病)等因素,可使患者体内含有治疗性抗体、嗜异性抗体、自身抗体、类风湿因子等,可能会产生假阳性。由妊娠引起的孕产妇血检测结果假阳性还可累及新生儿血清的假阳性,可能是高浓度的甲胎蛋白形成二聚体产生的非特异性吸附有关。样本长期存放于冰箱,血清中免疫球蛋白G聚合成多聚体,甲胎蛋白可形成二聚体,产生的非特异性吸附,可能导致本底过深。溶血时释放到血清中的血红蛋白具有过氧化物酶的性质,当其通过吸附或“PP效应”(蛋白质间相互吸附的现象)相互结合产生非特异性反应。补体、纤维蛋白或黄疸也会引起非特异性反应。机体内前母B淋巴细胞非特异激活,导致非特异的IgA或IgM产生,也会引起抗体检测的非特异性反应。样本或试剂细菌污染变质,细菌产生的过氧化物酶或其他物质,也会使本底升高。双抗体夹心法测抗原特别注意点是类风湿因子的干扰。类风湿因子是一种自身抗体,多为IgM型,能和多种动物IgG的Fc段结

合。亲和素或链霉亲和素吸附酶标板子的能力特别强,容易造成假阳性。另外标记物的非特异性吸附会直接导致非特异性反应升高。

[0004] 以往为了解决以上问题,采取的方法有直接用生理盐水或样本稀释液将样本进行10~1000倍的稀释来减少非特异性反应,或者在样本加入时同时加入含有样本处理剂的样本稀释液。处理剂为抗人IgG和/或还原剂 $\beta$ -巯基乙醇、二硫苏糖醇、重亚硫酸钾和半胱氨酸等。采用稀释法或样本处理液法会使低浓度的待检测抗体因过度稀释导致低于试剂盒检测限以下,产生漏检。在样本稀释液中加入抗人IgG单克隆抗体或者多克隆抗体在检测抗体时会结合部分的待测IgG抗体,也会在一定程度上影响超敏免疫分析的灵敏度,由于抗人IgG在批次间亲和力的差异和效价差异,抗人IgG的使用量也难以控制。还原剂 $\beta$ -巯基乙醇、二硫苏糖醇具有特殊的刺激性气味,且在检测总抗体时,特异性的待测IgM抗体结构也被破坏,特异性IgM抗体的检测灵敏度下降,影响了急性感染疾病的早期、病毒的潜伏期感染和慢性感染的再次激活的诊断。并且以往在稀释液或封闭液中常添加一些小牛血清、鼠血清、牛血清白蛋白、酪蛋白、十二烷基硫酸钠(SDS)、吐温(tween)、曲拉通(triton)、Pluronic F-68、Brij 35、聚乙烯醇和乙烯吡咯烷酮等物质来降低非特异性反应,但在实践中,还是发现会出现较多的非特异性反应。特别是吐温(tween)在低温条件下,吐温(tween)会产生胶束析出现象,使稀释液出现浑浊不均匀现象,严重影响免疫检测。离子型去污剂如SDS则破坏蛋白的结构。吐温(tween)和曲拉通(triton)具有削弱疏水性吸附的作用,甚至可使已吸附的蛋白质脱落,高浓度会使特异性的阳性反应减弱。在双抗体夹心法中还采用F(ab')或Fab片段作酶结合物的试剂,由于去除了Fc段,从而消除类风湿因子的干扰。但以上方法使用后,在临床扩大应用中还是出现了不少假阳性的结果。

## 发明内容

[0005] 基于此,本发明的目的在于克服上述现有技术的不足之处而提供一种改良实验缓冲液,可有效降低免疫分析法中的非特异性反应,提高了检测分辨率、准确性和精密度。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:一种改良实验缓冲液,包含以下组分:基础实验缓冲液、氯化钠和解离剂;所述解离剂选自8-苯胺基萘-1-磺酸盐、柳硫汞、水杨酸钠和三氯醋酸钠中的至少一种。

[0007] 优选地,所述基础实验缓冲液为pH6.0~9.0的Tris-HCl缓冲液、PB缓冲液、MOPS缓冲液或巴比妥缓冲液。

[0008] 优选地,所述改良实验缓冲液中氯化钠的质量体积比为1.60%~10.00%;优选为1.60%~3.40%;更优选为2.55%。

[0009] 优选地,所述解离剂在改良实验缓冲液中的质量体积比分别为:8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.005%~0.2%、柳硫汞0.005‰~0.05‰、水杨酸钠0.02%~0.5%和三氯醋酸钠0.05%~0.5%。

[0010] 优选地,所述解离剂在改良实验缓冲液中的质量体积比分别为:8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.02%~0.1%、柳硫汞0.01‰~0.03‰、水杨酸钠0.05%~0.3%和三氯醋酸钠0.1%~0.3%。

[0011] 优选地,所述解离剂在改良实验缓冲液中的质量体积比分别为:8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.08%、柳硫汞0.02‰、水杨酸钠0.2%和三氯醋酸钠0.2%。

[0012] 优选地,所述解离剂为8-苯胺基萘-1-磺酸盐和柳硫汞。

[0013] 本申请发明人经过大量的研究和分析发现,当解离剂为8-苯胺基萘-1-磺酸盐和柳硫汞时,改良实验缓冲液促进发生非特异性免疫反应或非特异吸附的蛋白质配体解离的效果最好,能更有效地降低免疫分析非特异反应。

[0014] 优选地,所述改良实验缓冲液还可以包含以下组分:动物血清、动物蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和防腐剂;所述动物血清选自小牛血清、鼠血清、羊血清和马血清中的至少一种;所述动物蛋白选自酪蛋白、牛IgG、牛血清白蛋白和胰蛋白胨中的至少一种。

[0015] 优选地,所述改良实验缓冲液中动物血清的体积比为10%;动物蛋白的质量体积比为0.20%;Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%;防腐剂的体积比为0.10%。

[0016] 本发明所述质量体积比中,质量单位为g,体积单位为mL。

[0017] 本发明还提供了所述改良实验缓冲液在基于抗原抗体结合的免疫分析法中的应用。

[0018] 优选地,所述基于抗原抗体结合的免疫分析法为双抗原夹心免疫分析法或双抗体夹心免疫分析法。

[0019] 在使用双抗原夹心免疫分析法或双抗体夹心免疫分析法检测样本时,使用本发明所述改良实验缓冲液稀释检测标记物,可有效降低非特异性反应。

[0020] 用本发明改良实验缓冲液稀释标记物至工作浓度,然后采用常规一步双抗夹心法或两步双抗夹心法进行检测。

[0021] 相对于现有技术,本发明的有益效果为:(1)本发明改良实验缓冲液具有适宜的高离子强度,在此离子强度下,能有效降低静电力,促进非特异性免疫反应或非特异吸附的低亲和力蛋白质配体发生溶解解离,降低了非特异性结合,同时解离剂可促进发生非特异性免疫反应或非特异吸附的蛋白质配体解离,从而有效降低免疫分析非特异反应;(2)本发明解决了现有免疫分析法中通过过度稀释样本、使用较高剂量的样本处理剂处理样本、加入过高加入表面活性剂、异种动物血清或动物蛋白的加入以及大剂量使用大分子物质或聚合物等来降低抗原抗体非特异结合时造成的检测灵敏度降低的难题;(3)本发明改良实验缓冲液可有效降低双抗夹心法的非特异性反应,提高了检测分辨率、准确性和精密度,同时不影响检测的灵敏度;(4)柳硫汞对防腐剂在实验缓冲液的防腐效果中有增强作用,使实验缓冲液的有效期更长。

## 附图说明

[0022] 图1为使用本发明改良实验缓冲液(改良法)和常规实验缓冲液(对照法)检测梅毒螺旋体抗体时的浓度值线性图。

[0023] 图2为使用本发明改良实验缓冲液(改良法)和常规实验缓冲液(常规法)检测乙型肝炎病毒表面抗体时的浓度值线性图。

[0024] 图3为使用本发明改良实验缓冲液(改良法)和常规实验缓冲液(常规法)检测乙型肝炎病毒表面抗原时的浓度值线性图。

[0025] 图4为使用本发明改良实验缓冲液(改良法)和常规实验缓冲液(常规法)检测乙型肝炎病毒e抗原时的浓度值线性图。

## 具体实施方式

[0026] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0027] 本发明使用的试剂均可通过购买获得。

### [0028] 实施例1

[0029] 本发明改良实验缓冲液的一种实施例,包含以下组分:Tris-HCl缓冲液、氯化钠、8-苯胺基萘-1-磺酸盐、硫柳汞、小牛血清、酪蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和Procline300;

[0030] 所述氯化钠的质量体积比为2.55%;8-苯胺基萘-1-磺酸盐的质量体积比为0.08%;硫柳汞的质量体积比为0.02%;小牛血清的体积比为10%;酪蛋白的质量体积比为0.2%;Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%;Procline300的体积比为0.1%。

[0031] 所述改良实验缓冲液配制方法如下:按1L的配制量进行配制,准确称取6.06g Tris,0.01g Na<sub>2</sub>EDTA,2.0g酪蛋白,25.50g氯化钠,0.8g 8-苯胺基萘-1-磺酸盐,0.02g硫柳汞加入一洁净容器中,加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解,缓慢加入3.0mL HCl充分混匀,然后加入100mL的小牛血清和1.0mL的Procline300,补足纯化水至1000mL,充分混匀。

### [0032] 实施例2

[0033] 本发明改良实验缓冲液的一种实施例,包含以下组分:PB缓冲液、氯化钠、8-苯胺基萘-1-磺酸盐、小牛血清、牛血清白蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和Procline300;

[0034] 所述氯化钠的质量体积比为10.00%;8-苯胺基萘-1-磺酸盐的质量体积比为0.2%;小牛血清的体积比为10%;牛血清白蛋白的质量体积比为0.2%;Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%;Procline300的体积比为0.1%。

[0035] 所述改良实验缓冲液配制方法如下:按1L的配制量进行配制,准确称取2.32g十二水磷酸氢二钠,0.44g二水磷酸二氢钠,0.01g Na<sub>2</sub>EDTA,2.0g牛血清白蛋白,100.0g氯化钠,2.0g 8-苯胺基萘-1-磺酸盐加入一洁净容器中,加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解,然后加入100mL的小牛血清和1.0mL的Procline300,补足纯化水至1000mL,充分混匀。

### [0036] 实施例3

[0037] 本发明改良实验缓冲液的一种实施例,包含以下组分:MOPS缓冲液、氯化钠、水杨酸钠、鼠血清、胰蛋白胍、Na<sub>2</sub>EDTA和Procline300;

[0038] 所述氯化钠的质量体积比为1.60%;水杨酸钠的质量体积比为0.5%;鼠血清的体积比为10%;胰蛋白胍的质量体积比为0.2%;Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%;Procline300的体积比为0.1%。

[0039] 所述改良实验缓冲液配制方法如下:按1L的配制量进行配制,准确称取10.46g 3-(N-吗啉)丙磺酸,8.50ml三乙醇胺,0.01g Na<sub>2</sub>EDTA,2.0g胰蛋白胍,16.0g氯化钠,5.0g水杨酸钠加入一洁净容器中,加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解,然后加入100mL的鼠血清和1.0mL的Procline300,补足纯化水至1000mL,充分混匀。

### [0040] 实施例4

[0041] 本发明改良实验缓冲液的一种实施例,包含以下组分:巴比妥缓冲液、氯化钠、柳硫汞、三氯醋酸钠、小牛血清、酪蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和Procline300;

[0042] 所述氯化钠的质量体积比为3.40%;柳硫汞的质量体积比为0.05%;三氯醋酸钠

的质量体积比为0.5%；小牛血清的体积比为10%；酪蛋白的质量体积比为0.2%；Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%；Procline300的体积比为0.1%。

[0043] 所述改良实验缓冲液配制方法如下：按1L的配制量进行配制，准确称取2.76g巴比妥，15.45g巴比妥钠，0.01g Na<sub>2</sub>EDTA，2.0g酪蛋白，34.0g氯化钠，0.05g硫柳汞、5.0g三氯醋酸钠加入一洁净容器中，加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解，然后加入100mL的小牛血清和1.0mL的Procline300，补足纯化水至1000mL，充分混匀。

[0044] 实施例5

[0045] 本发明改良实验缓冲液的一种实施例，包含以下组分：Tris-HCl缓冲液、氯化钠、8-苯胺基萘-1-磺酸盐、硫柳汞、水杨酸钠、三氯醋酸钠、小牛血清、酪蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和Procline300；

[0046] 所述氯化钠的质量体积比为5.00%；8-苯胺基萘-1-磺酸盐的质量体积比为0.005%；硫柳汞的质量体积比为0.005%；水杨酸钠的质量体积比为0.02%；三氯醋酸钠的质量体积比为0.05%；小牛血清的体积比为10%；酪蛋白的质量体积比为0.2%；Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%；Procline300的体积比为0.1%。

[0047] 所述改良实验缓冲液配制方法如下：按1L的配制量进行配制，准确称取6.06g Tris，0.01g Na<sub>2</sub>EDTA，2.0g酪蛋白，50.0g氯化钠，0.05g 8-苯胺基萘-1-磺酸盐，0.005g硫柳汞，0.20g水杨酸钠，0.50g三氯醋酸钠加入一洁净容器中，加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解，缓慢加入3.0mL HCl充分混匀，然后加入100mL的小牛血清和1.0mL的Procline300，补足纯化水至1000mL，充分混匀。

[0048] 实施例6

[0049] 本发明改良实验缓冲液的一种实施例，包含以下组分：Tris-HCl缓冲液、氯化钠、水杨酸钠、三氯醋酸钠、羊血清、酪蛋白、Na<sub>2</sub>EDTA和Procline300；

[0050] 所述氯化钠的质量体积比为8.5%；水杨酸钠的质量体积比为0.2%；三氯醋酸钠的质量体积比为0.2%；羊血清的体积比为10%；酪蛋白的质量体积比为0.2%；Na<sub>2</sub>EDTA的质量体积比为0.001%；Procline300的体积比为0.1%。

[0051] 所述改良实验缓冲液配制方法如下：按1L的配制量进行配制，准确称取6.06g Tris，0.01g Na<sub>2</sub>EDTA，2.0g酪蛋白，85.0g氯化钠，2.0g水杨酸钠，2.0g三氯醋酸钠加入一洁净容器中，加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解，缓慢加入3.0mL HCl充分混匀，然后加入100mL的羊血清和1.0mL的Procline300，补足纯化水至1000mL，充分混匀。

[0052] 实施例7本发明改良实验缓冲液在双抗原夹心免疫分析法检测中的应用

[0053] 为了研究本发明改良实验缓冲液在双抗原夹心免疫分析法检测中的使用效果，本实施例以实施例1中改良实验缓冲液为例，利用实施例1中改良实验缓冲液来稀释标记物（改良组），同时设置常规实验缓冲液对照（对照组），所述常规实验缓冲液与实施例1中改良实验缓冲液相比具有以下不同：（1）氯化钠的使用量较低；（2）不含解离剂，其他成分和使用量均相同。

[0054] 所述常规实验缓冲液由以下配方和方法配制得到：按1L的配制量进行配制，准确称取6.06g Tris，0.01g Na<sub>2</sub>EDTA，2.0g酪蛋白，8.50g氯化钠加入一洁净容器中，加入300mL纯化水使固体试剂充分溶解，缓慢加入3.0mL HCl充分混匀，然后加入100mL的小牛血清和1.0mL的Procline300，补足纯化水至1000mL，充分混匀。

[0055] (一) 实验材料

[0056] 人类免疫缺陷病毒抗体1+2型测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)用的抗-HIV阴性对照品、抗-HIV 1型阳性对照品、抗-HIV 2型阳性对照品、抗-HIV钋标记物、浓缩洗液、增强液、抗-HIV微孔反应板均由广州市丰华生物工程有限公司提供。采用二步双抗原夹心法进行检测。

[0057] (二) 实验方法

[0058] 采用二步双抗原夹心法,操作步骤如下:

[0059] 1、试剂准备

[0060] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。

[0061] ②洗涤液:将“浓缩洗液”用纯化水在干净的容器中按体积比1:25倍稀释,混匀,作为工作洗涤液备用。

[0062] ③钋标记物工作液:分别使用改良组和对照组中的“实验缓冲液”按体积比1:20稀释“钋标记物”,加进洁净的一次性容器中并充分混匀稀释成工作液。

[0063] 2、试验操作

[0064] ①吸取100μL的对照品或待测样本依次加入微孔反应板的微孔中,加贴封片。一般情况,试剂中的“抗-HIV阴性对照品”做3孔的复孔,“抗-HIV 1型阳性对照品”和“抗-HIV 2型阳性对照品”均至少做1孔。待测样本可作单孔检测。

[0065] ②微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育60min。

[0066] ③第一步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤4次,拍干。

[0067] ④向每孔中加入100μL已配好的标记物工作液,加贴封片。

[0068] ⑤微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育45min。

[0069] ⑥第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0070] ⑦向每孔中加入增强液100μL。

[0071] ⑧微孔反应板条于室温下缓慢振荡5min后上机检测,在30min内完成检测。

[0072] 参考值计算公式为:截断值(cut off value,COV) = 2.1 × NCx。

[0073] (三) 实验结果

[0074] (1) 特异度:875份经罗氏公司抗-HIV1+2型试剂检测抗-HIV阴性样本,改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法(简称改良法)与常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法(简称常规法)经对比实验检测,结果如表1所示:

[0075] 表1检测结果

[0076]

指标	常规法	改良法
阴性样本的荧光值（均数±标准差）	669.89±335.21	638.04±188.04
荧光值变异系数	50.04%	29.60%
S/CO 值在 0.50~0.79 的样本数	7 份	1 份, 其 S/CO 值为 0.53
S/CO 值在 0.80~0.99 的样本数	2 份, 其中 1 例样本 S/CO 值为 0.957	0 份

[0077] 上述实验结果表明改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测抗-HIV阴性样本较常规法本底低,且阴性样本的检测荧光值分布集中降低,精密性好,明显降低了非特异性反应。

[0078] (2) 灵敏度:10份临床抗-HIV阳性样本均经1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640稀释,采用常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法和改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测,两者检出的稀释度均一致,表明本发明改良实验缓冲液在降低非特异性反应的同时不会影响检测的灵敏度。

[0079] (3) 国家参考品评价:常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法和改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法均达到以下标准:

[0080] ①阴性参考品符合率:用阴性国家参考品或阴性企业参考品进行检定,20份人类免疫缺陷病毒抗体阴性参考品,阴性符合率为20/20;

[0081] ②阳性参考品符合率:用阳性国家参考品或阳性企业参考品进行检定,20份人类免疫缺陷病毒抗体阳性参考品,阳性符合率为20/20,P11、P12号样品的检测荧光值 $P12 \geq P11$ ;用企业提供的样品进行检测,2份人类免疫缺陷病毒1型0组阳性样品,阳性符合率(+ / +)为2/2;

[0082] ③最低检出限:用最低检出限国家参考品或最低检出限企业参考品进行检定,6份最低检出限样品,阳性反应均能检出5份样本;且基质血清S1为阴性反应;

[0083] ④精密性:用精密性国家参考品或精密性企业参考品进行检定,平行检测10次,其检测荧光值的 $CV \leq 15\%$ ;常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法 $CV$ 为6.54%,改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法 $CV$ 为4.36%。

[0084] 实施例8

[0085] 本实施例研究本发明改良实验缓冲液在双抗原夹心免疫分析法检测梅毒螺旋体抗体中的应用。

[0086] (一) 实验材料:梅毒螺旋体抗体测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)用的抗-TP校准品、抗-TP标记物、浓缩洗液、增强液、抗-TP微孔反应板均由广州市丰华生物工程有限

公司提供。利用同实施例7的改良实验缓冲液和常规基础实验缓冲液进行对比试验。采用二步双抗原夹心法进行检测。

[0087] (二) 实验方法

[0088] 1、试剂准备

[0089] 1) 微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。

[0090] 2) 洗涤液:将“浓缩洗液”用纯化水在干净的容器中按体积比1:25倍稀释,混匀,作为工作洗涤液备用。

[0091] 3) 标记物工作液:“钡标记物”与“实验缓冲液”按1:20稀释,加进洁净的一次性容器中并充分混匀稀释成工作液。

[0092] 2、试验操作

[0093] 1) 吸取100μL的“抗-TP校准品”或待测样本依次加入微孔反应板的微孔中,加贴封片。一般情况,校准品至少做2孔的复孔。

[0094] 2) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育60min小时。

[0095] 3) 第一步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤4次,拍干。

[0096] 4) 向每孔中加入100μL已配好的标记物工作液,加贴封片。

[0097] 5) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育60min小时。

[0098] 6) 第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0099] 7) 向每孔中加入增强液100μL。

[0100] 8) 微孔反应板条于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30分钟内完成检测。

[0101] 试剂盒参考值定为:2.5mIU/mL。

[0102] (三) 实验结果

[0103] 1) 特异度:2655份日本富士瑞必欧株式会社TPPA法检测抗-TP试剂阴性样本,改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法(简称改良法)与常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法(简称常规法)经对比实验检测,结果如表2所示:

[0104] 表2检测结果

[0105]

指标	常规法	改良法
阴性样本的荧光值 (均数±标准差)	5352.08±6147.65	1284.79±430.20
荧光值变异系数	114.86%	33.48%
浓度值	浓度值在 1.0~1.99 mIU/mL 的有 168 份; 浓度值在 2.0~2.49 mIU/mL 的有 43 份; 浓度值大于 2.5 mIU/mL 的有 44 份, 浓度值在 2.52~11.01 mIU/mL 之间	浓度值均在 0.08 mIU/mL 以内
假阳性率	1.66%	0%

[0106] 上述实验结果表明改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测抗-TP阴性样本较常规法本底低,且阴性样本的检测荧光值分布集中降低,精密性好,明显降低了非特异性反应。常规实验缓冲液检测组的假阳性率为1.66%,而本发明改良实验缓冲液的假阳性率为0%,说明本发明改良实验缓冲液可有效降低非特异性反应,提高检测准确性。

[0107] 2) 灵敏度:10份临床抗-TP阳性样本均经1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640稀释,采用常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法和改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测,两者检出的稀释度均一致,表明本发明改良实验缓冲液在降低非特异性反应的同时不会影响检测的灵敏度。

[0108] 3) 阳性符合率与线性:95份经日本富士瑞必欧株式会社的TPPA法试剂检测为阳性的样本,2种方法检测符合率为100%,在常规法检测浓度为3.25~263.51 mIU/mL内。如图1所示,2种方法的浓度值线性回归方程为

[0109]  $Y=0.9925X+0.0414$ ,相关系数r为0.9984。表明本发明改良实验缓冲液与常规实验缓冲液检测线性范围内的临床阳性样本,结果的线性关系良好。

[0110] 实施例9

[0111] 本实施例研究本发明改良实验缓冲液在双抗原夹心免疫分析法检测乙型肝炎病毒表面抗体中的应用。

[0112] (一) 实验材料

[0113] 乙型肝炎病毒表面抗体测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)抗-HBs定标品、抗-HBs 钡标记物、浓缩洗液、增强液、抗-HBs微孔反应板均由广州市丰华生物工程有限公司提供。利用同实施例7的改良实验缓冲液和常规基础实验缓冲液进行对比试验。采用二步双抗原夹心法进行检测。

## [0114] (二) 实验方法

## [0115] 1、试剂的准备

[0116] 1) 将试剂及所需数量的微孔反应条置平衡至室温(20℃-25℃)。

[0117] 2) 洗涤液:将40mL浓缩洗液和960mL去离子水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。

[0118] 3) 抗-HBs标记物:使用前一小时内铈标记物用标记稀释实验缓冲液按1:20倍稀释并一次用完(使用干净的容器来配制)。

## [0119] 2、试验操作

[0120] 1) 吸取100μL的抗-HBs阴性对照、定标品及待检样本,按顺序加入微孔反应条小孔中并加贴封片。

[0121] 2) 微孔反应条在室温下,振荡仪缓慢振荡孵育45min。

[0122] 3) 在第一步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤4次,拍干。

[0123] 4) 每孔中加入100μL已稀释的抗-HBs标记物工作液。并加贴封片。

[0124] 5) 微孔反应条在室温下,振荡仪缓慢振荡孵育45min。

[0125] 6) 第二次孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0126] 7) 每一孔中加入增强液100μL。加样过程中避免碰到小孔边缘或其中的试剂。尽量避免污染。

[0127] 8) 微孔反应条在室温下,用振荡仪缓慢振荡5分钟。

[0128] 试剂盒参考值定为:10mIU/mL。

## [0129] (三) 实验结果

[0130] 1) 特异度:131份经雅培抗-HBs试剂检测为阴性样本,改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法(简称改良法)与常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法(简称常规法)经对比实验检测,结果如表3所示:

[0131] 表3检测结果

[0132]

指标	常规法	改良法
阴性样本的荧光值 (均数±标准差)	6726.17± 4295.85	2255.50±592.75
荧光值变异系数	63.87%	26.28%
浓度值	浓度值在 8.00~ 8.99mIU/mL 的有 4 份; 9.00~9.99 mIU/mL 的有 6	浓度值在 8.00~ 8.99mIU/mL 的有 0 份;浓 度值在 9.00~9.99

[0133]

	份, 最高 1 份样本为 9.98mIU/mL	mIU/mL 的有 2 份, 最高 1 份样本为 9.49mIU/mL, 且 该 2 份为雅培临界值样本
--	----------------------------	--

[0134] 上述实验表明改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测抗-HBs阴性样本较常规法本底低,且阴性样本的检测荧光值大部分减低,明显降低了非特异性反应。

[0135] 2) 灵敏度:10份临床抗-HBs阳性样本均经1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640稀释,采用常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法和改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测,两者检出的稀释度均一致,表明本发明改良实验缓冲液在降低非特异性反应的同时不会影响检测的灵敏度。2种方法检测浓度值(5.0~1200mIU/mL内)的线性相关系数r达0.9965。

[0136] 3) 阳性符合率与线性:44份经雅培试剂检测抗-HBs阳性样本,2种方法检测符合率为100%,在常规法检测浓度为10.11~1208.61mIU/mL内。如图2所示,2种方法的浓度值线性回归方程为 $Y=1.0235X-0.4417$ ,相关系数r为0.9980。表明本发明改良实验缓冲液与常规实验缓冲液检测线性范围内的临床阳性样本,结果的线性关系良好。

[0137] 实施例10

[0138] 本实施例研究本发明改良实验缓冲液在双抗原夹心免疫分析法检测丙型肝炎病毒抗体中的应用。

[0139] (一) 实验材料

[0140] 丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)的抗-HCV校准品、钨标记物、生物素标记抗原、样本稀释液、抗-HCV微孔反应板、浓缩洗液、增强液均由广州市丰华生物工程有限公司提供。利用同实施例7的改良实验缓冲液和常规基础实验缓冲液进行对比试验,采用一步双抗原夹心法进行检测。

[0141] (二) 实验方法

[0142] 1、试剂准备

[0143] 1) 微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。余下的微孔板条及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0144] 2) 洗涤工作液:将浓缩洗液用纯化水在干净的容器中按体积比1:25倍稀释,混匀,作为工作洗涤液备用。纯化水敬请用户自备。

[0145] 3) 生物素标记抗原工作液:使用前30min配制,按所需量将生物素标记抗原与样本稀释液按体积比1:20加进洁净的一次性容器中并混匀,当次试验用完。

[0146] 4) 钨标记物工作液:将钨标记物与实验缓冲液按体积比1:20加进洁净的一次性容器中并混匀。

[0147] 2、试验操作

[0148] 1) 吸取50μL的抗-HCV校准品、待测样本依次加入微孔反应板的微孔中,并在每一孔中加入50μL的生物素标记抗原工作液。

[0149] 2) 将加好样本的微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育45min。

[0150] 3) 第一步孵育结束后,用洗板机洗涤5次。

- [0151] 4) 向每孔中加入100 $\mu$ L已配好的铕标记物工作液。  
 [0152] 5) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育15min。  
 [0153] 6) 第三步孵育结束后,用洗板机洗涤5次。  
 [0154] 7) 向每孔中加入增强液100 $\mu$ L。  
 [0155] 8) 微孔反应板条于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30min内完成检测。  
 [0156] 试剂盒参考值定为:待测样本抗-HCV检测结果 $<0.05$ NCU/mL,判为阴性,否则为阳性。

[0157] (三) 实验结果

[0158] 1) 特异度:631份经雅培抗-HCV试剂检测为阴性的体检人员样本,改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法(简称改良法)与常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法(简称常规法)经对比实验检测,结果如表4所示:

[0159] 表4检测结果

[0160]

指标	常规法	改良法
阴性样本的荧光值 (均数 $\pm$ 标准差)	499.13 $\pm$ 292.61	435.14 $\pm$ 69.56
荧光值变异系数	58.62%	15.99%
浓度值	临界浓度值(0.040 NCU/mL)的有3份	浓度值均为0.01 NCU/mL

[0161] 上述实验表明改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测抗-HCV阴性样本较常规法本底低,且阴性样本的检测荧光值大部分减低,明显降低了非特异性反应。

[0162] 2) 10份临床抗-HCV阳性样本均经1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640稀释,采用常规基础实验缓冲液的双抗原夹心法和改良实验缓冲液的双抗原夹心免疫分析法检测,两者检出的稀释度均一致,表明本发明改良实验缓冲液在降低非特异性反应的同时不会影响检测的灵敏度。

[0163] 3) 阳性符合率与线性:40份经雅培抗-HCV试剂检测为阳性的样本,2种方法检测符合率为100%,在常规法检测浓度为0.065~4.000NCU/mL内,2种方法的浓度值线性相关系数r为0.9967。表明本发明改良实验缓冲液与常规实验缓冲液检测线性范围内的临床阳性样本,结果的线性关系良好。

[0164] 实施例11

[0165] 本实施例研究本发明改良实验缓冲液在双抗体夹心免疫分析法检测乙型肝炎病毒表面抗原中的应用。

[0166] (一) 实验材料

[0167] 乙型肝炎病毒表面抗原定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)的HBsAg定标品、铕标记物、HBsAg微孔反应板、浓缩洗液、增强液均由广州市丰华生物工程有限公司提供。利

用同实施例7的改良实验缓冲液和常规基础实验缓冲液进行对比试验,采用二步双抗体夹心法进行检测。

[0168] (二) 实验方法

[0169] 1、试剂准备

[0170] (1) 将试剂及所需数量的微孔反应条置室温平衡。

[0171] (2) 洗涤液:将40ml浓缩洗液和960ml去离子水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。

[0172] (3) HBsAg标记物:使用前一小时内用标记稀释实验缓冲液按1:20倍稀释并一次用完(使用干净的容器来配制)。

[0173] 2、试剂操作

[0174] (1) 吸取100u1的HBsAg定标品或待检样本,按顺序加入微孔反应条小孔中并加贴封片。

[0175] (2) 微孔反应条在室温下,用振荡仪缓慢振荡孵育1小时(如室温低于20℃时,则放入37℃恒温箱1小时)。

[0176] (3) 在第一步孵育结束后,小心将封片揭下并丢弃掉,用洗板机洗涤4次,拍干。

[0177] (4) 每孔中加入100u1已稀释的HBsAg标记物工作液,加贴封片。

[0178] (5) 微孔反应条在室温下,用振荡仪缓慢振荡孵育1小时(如室温低于20℃时,则放入37℃恒温箱1小时)。

[0179] (6) 第二次孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0180] (7) 每一孔中加入增强液100u1。加样过程中避免碰到小孔边缘或其中的试剂。尽量避免污染。

[0181] (8) 微孔反应条在室温下,用振荡仪轻荡5分钟。(在半小时内完成测定)。

[0182] 样品测定的浓度值显示为0UT且荧光值低于定标品A,或其测定浓度值小于0.2ng/ml,结果为阴性。

[0183] (三) 实验结果

[0184] 1) 特异度:232份经雅培HBsAg试剂检测为阴性的体检人员样本,改良实验缓冲液的双抗体夹心免疫分析法(简称改良法)与常规基础实验缓冲液的双抗体夹心法(简称常规法)经对比实验检测,结果如表5所示:

[0185] 表5检测结果

[0186]

指标	常规法	改良法
阴性样本的荧光值 (均数±标准差)	1602.97±1466.02	1361.93±624.30
荧光值变异系数	91.46%	45.85%
浓度值	浓度值在 0.1~0.19 ng/mL 范围内的样本 8 例, 浓度值在 0.21~1.91 ng/mL 范围内的样本 4 例 (假阳性结果)	浓度值均在为 0.01~0.06 ng/mL 以内
假阳性率	1.72%	0%

[0187] 上述结果表明本发明改良实验缓冲液的双抗体夹心免疫分析法检测HBsAg阴性样本较常规法本底低,且阴性样本的检测荧光值分布集中降低,精密性转好,明显降低了非特异性反应,增加了检测的准确性,避免出现假阳性结果。

[0188] 2) 灵敏度:10份临床HBsAg阳性样本均经1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640稀释,采用常规基础实验缓冲液的双抗体夹心法和改良实验缓冲液的双抗体夹心免疫分析法检测,两者检出的稀释度均一致,表明本发明改良实验缓冲液在降低非特异性反应的同时不会影响检测的灵敏度。

[0189] 3) 阳性符合率与线性:78份经雅培HBsAg试剂检测为阳性的样本,2种方法检测符合率为100%,在常规法检测浓度为0.23~264.41ng/mL范围内,如图3所示,2种方法的浓度值线性相关系数r为0.9983。表明本发明改良实验缓冲液与常规实验缓冲液检测线性范围内的临床阳性样本,结果的线性关系良好。

[0190] 实施例12

[0191] 本实施例研究本发明改良实验缓冲液在双抗体夹心免疫分析法检测乙型肝炎病毒e抗原中的应用。

[0192] (一) 实验材料

[0193] 乙型肝炎病毒e抗原测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)的校准品、标记物、微孔反应板、浓缩洗液、增强液均由广州市丰华生物工程有限公司提供。利用同实施例7的改良实验缓冲液和常规基础实验缓冲液进行对比试验,采用二步双抗体夹心法进行检测。

[0194] (二) 实验方法

[0195] 1、试剂准备

[0196] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。

[0197] ②洗涤液:将40mL浓缩洗液和960mL纯化水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。

[0198] ③标记物工作液:使用前30min内配制,将HBeAg标记物与实验缓冲液按体积比1:50加进洁净的一次性容器中并混匀,当次试验用完。

## [0199] 2、试验操作

[0200] ①吸取100 $\mu$ L的HBeAg校准品或待测样本依次加入微孔反应板的微孔中,加贴封片。一般情况,校准品至少做2孔的复孔。建议待测样本作复孔检测。

[0201] ②微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育1小时

[0202] ③第一步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤4次,拍干。

[0203] ④向每孔中加入100 $\mu$ L已配好的标记物工作液,加贴封片。

[0204] ⑤微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育1小时。

[0205] ⑥第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0206] ⑦向每孔中加入增强液100 $\mu$ L。

[0207] 微孔反应板条于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30分钟内完成检测。

[0208] 待测样本HBeAg检测结果 $<0.6$ NCU/mL,判为阴性,否则为阳性。

## [0209] (三) 实验结果

[0210] 1) 特异度:107份经雅培HBeAg试剂检测为阴性的体检人员样本,改良实验缓冲液的双抗体夹心免疫分析法(简称改良法)与常规基础实验缓冲液的双抗体夹心法(简称常规法)经对比实验检测,结果如表6所示:

[0211] 表6检测结果

[0212]

指标	常规法	改良法
阴性样本的荧光值 (均数 $\pm$ 标准差)	1702.98 $\pm$ 1080.89	1188.48 $\pm$ 385.89
荧光值变异系数	63.47%	32.47%
浓度值	浓度值在0.1~0.49 NCU/mL范围内的样本有23份;浓度值在0.5~0.59 NCU/mL范围内的样本有2份	浓度值均在0.05~0.09 NCU/mL内

[0213] 上述结果表明本发明改良实验缓冲液的双抗体夹心免疫分析法检测HBeAg阴性样本较常规法本底低,且阴性样本的检测荧光值分布集中降低,精密性转好,明显降低了非特异性反应。

[0214] 2) 灵敏度:10份临床HBeAg阳性样本均经1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640稀释,采用常规基础实验缓冲液的双抗体夹心法和改良实验缓冲液的双抗体夹心免疫分析法检测,两者检出的稀释度均一致,表明本发明改良实验缓冲液在降低非特异性反应的同时不会影响检测的灵敏度。

[0215] 3) 阳性符合率与线性:67份经雅培抗-HCV试剂检测为阳性的样本,2种方法检测符合率为100%,常规法检测浓度为0.66~209.71NCU/mL范围内,如图4所示,2种方法的浓度值线性相关系数 $r$ 为0.9983。表明本发明改良实验缓冲液与常规实验缓冲液检测线性范围

内的临床阳性样本,结果的线性关系良好。

[0216] 实施例13

[0217] 本实施例研究氯化钠的使用量对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响。

[0218] (一) 实验设计

[0219] 本发明改良实验缓冲液中氯化钠的质量体积比为1.60%~10.00%;优选为1.60%~3.40%;更优选为2.55%。为了研究氯化钠的使用量对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响,设置实验组1~11和对照组1~2,具体如表7所示。除了氯化钠的使用量不同外,改良实验缓冲液其他组分、组分的使用量以及配置方法同实施例1。

[0220] 表7实验设计

[0221]

组别	氯化钠的使用量/g	氯化钠的质量体积比
实验组1	16.0	1.60%
实验组2	25.5	2.55%
实验组3	34.0	3.40%
实验组4	42.5	4.25%
实验组5	51.0	5.10%
实验组6	59.5	5.95%
实验组7	68.0	6.80%
实验组8	76.5	7.65%
实验组9	85.0	8.50%
实验组10	93.5	9.35%
实验组11	100	10.00%
对照组1	15	1.50%
对照组2	105	10.50%

[0222] (二) 实验方法

[0223] 本实施例采用梅毒螺旋体抗体测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法) 二步双抗原夹心法对不同氯化钠使用量的改良实验缓冲液的效果进行验证,用表7各组配制得到的实验缓冲液来检测抗-TP阴性(日本富士瑞必欧株式会社TPPA法) 样本40例,低、中、高阳性质控品各1份。检测步骤同实施例8。

[0224] (三) 实验结果

[0225] 各组检测结果如表8所示:

[0226] 表8检测结果

[0227]

组别	氯化钠质量体积比	阴性样本荧光值均值	阴性样本荧光值变异系数	低质控荧光值	中质控荧光值	高质控荧光值
实验组 1	1.60%	1392.14	41.89%	56863	179960	585633
实验组 2	2.55%	1127.31	33.64%	59494	176322	595615
实验组 3	3.40%	1096.75	37.61%	60098	175807	599910
实验组 4	4.25%	1495.25	33.99%	59470	175462	594694
实验组 5	5.10%	1212.32	38.58%	57803	163594	599264
实验组 6	5.95%	1388.39	41.35%	59459	165089	584002
实验组 7	6.80%	1212.79	37.90%	53027	171778	572884
实验组 8	7.65%	1184.06	37.04%	52887	170555	569817
实验组 9	8.50%	1271.11	39.89%	56981	172479	570925
实验组 10	9.35%	1195.36	36.08%	55738	176174	540331
实验组 11	10.00%	1236.81	35.00%	54188	176077	548198
对照组 1	1.50%	7731.03	83.34%	60758	163571	591287
对照组 2	10.50%	654.23	42.35%	27929	81960	290256

[0228] 由上述结果可知,含1.50%氯化钠的实验缓冲液检测抗-TP阴性样本40例本底(阴性样本荧光值均值为7731.03)和变异系数(83.34%)明显高于含有1.60%、2.55%、3.40%、4.25%、5.10%、5.95%、6.80%、7.65%、8.50%、9.35%、10.00%氯化钠的实验缓冲液结果。含1.50%氯化钠的实验缓冲液检测40阴性样本,有2例样本检测浓度值在临界区(1.25~2.5mIU/mL)内。含1.50%~10.00%氯化钠的实验缓冲液检测低、中、高阳性质控品检测荧光值差异不明显。含1.60%、2.55%、3.40%、4.25%、5.10%、5.95%、6.80%、7.65%、8.50%、9.35%、10.00%氯化钠的实验缓冲液检测阴性样本的荧光值均值及变异系数差异也不大,检测阴性样本浓度值均在0~0.10mIU/mL内。本发明改良实验缓冲液中氯化钠的使用量是发明人经过大量研究得出的选择,在本发明范围内(1.60%~10.00%)可使改良实验缓冲液具有最合适的离子浓度,保证其使用效果(实验组1~11);氯化钠的使用量低于1.60%(对照组1)或高于10.00%(对照组2)均会明显影响改良实验缓冲液的使用效果。根据上述实验结果,氯化钠的使用量优选1.60%~3.40%,为了保证实验缓冲液的批间稳定性、通用性及节省原料,更优选2.55%。

[0229] 实施例14

[0230] 本实施例研究8-苯胺基萘-1-磺酸盐(ANS)的使用量对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响。

[0231] (一) 实验设计

[0232] 本发明改良实验缓冲液中8-苯胺基萘-1-磺酸盐的质量体积比为0.005%~0.2%,优选为0.02%~0.1%,更优选为0.08%。为了研究8-苯胺基萘-1-磺酸盐的使用量

对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响,设置实验组12~18和对照组3~4,具体如表9所示。除了8-苯胺基萘-1-磺酸盐的使用量不同外,改良实验缓冲液其他组分、组分的使用量以及配置方法同实施例1。

[0233] 表9实验设计

[0234]

组别	ANS的使用量/g	ANS的质量体积比
实验组12	0.05	0.005%
实验组13	0.1	0.01%
实验组14	0.2	0.02%
实验组15	0.4	0.04%
实验组16	0.8	0.08%
实验组17	1.0	0.10%
实验组18	2.0	0.20%
对照组3	0	0%
对照组4	2.5	0.25%

[0235] (二) 实验方法

[0236] 本实施例采用梅毒螺旋体抗体测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法) 二步双抗原夹心法对不同8-苯胺基萘-1-磺酸盐使用量的改良实验缓冲液的效果进行验证,用表9各组配制得到的实验缓冲液来检测抗-TP结果在灰区而TPPA法(日本富士瑞必欧株式会社)检测阴性样本40例,低、中、高阳性质控品各1份。检测步骤同实施例8。

[0237] (三) 检测结果

[0238] 各组检测结果如表10所示:

[0239] 表10检测结果

[0240]

组别	ANS 质量体 积比	阴性样本荧 光值均值	阴性样本浓度范 围 (mIU/mL)	低质控 荧光值	中质控 荧光值	高质控 荧光值
实验组 12	0.005%	5069.20	0.28-0.73	75957	235264	627151
实验组 13	0.01%	3652.65	0.05-0.18	69850	226075	661296
实验组 14	0.02%	1309.25	0.05-0.10	77205	241935	670294
实验组 15	0.04%	1210.60	0.05-0.10	75166	244174	679730
实验组 16	0.08%	1196.65	0.05-0.10	77336	222709	679757
实验组 17	0.10%	1272.60	0.05-0.10	73950	229755	648646
实验组 18	0.20%	1527.75	0.05-0.10	69258	218077	633453
对照组 3	0	20107.80	1.00-7.63	72677	206353	654363
对照组 4	0.25%	1154.02	0.05-1.00	53806	166461	482762

[0241] 由上述结果可知,40例抗-TP结果处于灰区而TPPA法检测阴性样本,在ANS的剂量为0时,检测有7例大于参考值2.5mIU/mL的假阳性样本,33例阴性检测本底均较高(本底荧光值均值为20107.80),当加入含量为0.005%的8-苯胺基萘-1-磺酸盐(ANS)后本底明显下降,随着加入量的增加,本底进一步降低,在8-苯胺基萘-1-磺酸盐(ANS)使用量为0.02%~0.10%时,检测本底低,阴性样本荧光值均值结果稳定,低、中、高阳性质控检测荧光值也基本一致。但在0.25%的8-苯胺基萘-1-磺酸盐(ANS)量时,低、中、高阳性质控检测荧光值均稍有降低,对免疫反应可能开始出现抑制。本发明改良实验缓冲液中8-苯胺基萘-1-磺酸盐的使用量是发明人经过大量研究得出的选择,在本发明范围内(0.005%~0.2%)可保证改良实验缓冲液的使用效果(实验组12~18);不使用8-苯胺基萘-1-磺酸盐(对照组3)或使用量高于0.2%(对照组4)时均会明显影响改良实验缓冲液的使用效果。根据上述实验结果,8-苯胺基萘-1-磺酸盐(ANS)的使用量优选0.02%~0.10%,更优选0.08%。

[0242] 实施例15

[0243] 本实施例研究柳硫汞的使用量对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响。

[0244] (一) 实验设计

[0245] 本发明改良实验缓冲液中柳硫汞的质量体积比为0.005‰~0.05‰,优选为0.01‰~0.03‰,更优选为0.02‰。为了研究柳硫汞的使用量对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响,设置实验组19~28和对照组5~6,具体如表11所示。除了柳硫汞的使用量不同外,改良实验缓冲液其他组分、组分的使用量以及配置方法同实施例1。

[0246] 表11实验设计

[0247]

组别	柳硫汞的使用量/g	柳硫汞的质量体积比
实验组19	0.005	0.005‰
实验组20	0.006	0.006‰
实验组21	0.007	0.007‰
实验组22	0.008	0.008‰
实验组23	0.01	0.01‰
实验组25	0.02	0.02‰
实验组26	0.03	0.03‰
实验组27	0.04	0.04‰
实验组28	0.05	0.05‰
对照组5	0	0%
对照组6	0.06	0.06‰

[0248] (二) 实验方法

[0249] 1、按表11配制好的各组改良实验缓冲液均各分装9瓶,分别按2~8℃旋紧瓶盖保存,37℃、实验室常温条件下旋松瓶盖,能让液体与空气接触,各温度条件下放置3瓶,每7天对外观检查一次。

[0250] 2、本实施例采用梅毒螺旋体抗体测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法) 二步双抗原夹心法对不同柳硫汞使用量的改良实验缓冲液的效果进行验证,检测步骤同实施例8。

[0251] (三) 实验结果

[0252] (1) 随着柳硫汞的加入,缓冲液防腐能力增强,对照组5中的实验缓冲液在21天后,37℃、实验室常温条件下旋松瓶盖的实验缓冲液有浑浊现象,并出现臭鸡蛋气味,而含有柳硫汞的实验缓冲液未出现该现象。在14个月后观察,0.005‰~0.008‰柳硫汞的实验缓冲液,37℃、实验室常温条件下旋松瓶盖的实验缓冲液均有少量絮状物或片状物出现。但在2~8℃旋紧瓶盖保存及37℃、实验室常温旋松瓶盖条件下,0.06‰柳硫汞的实验缓冲液中,出现了少许黑色颗粒沉淀物。说明柳硫汞对防腐剂Procline300在实验缓冲液的防腐效果中有增强作用。

[0253] 用37℃、实验室常温条件下旋松瓶盖的含0~0.008‰柳硫汞的实验缓冲液,检测40例阴性样本,检测荧光值(均值为5581.03)明显高于2~8℃旋紧瓶盖保存缓冲液检测荧光值(均值小于1300)。而0.01‰~0.05‰柳硫汞的实验缓冲液,2~8℃旋紧瓶盖保存及37℃、实验室常温旋松瓶盖条件下,检测阴性样本荧光值本底低且差异不明显。说明实验缓冲液变质对本底荧光值检测有明显影响。

[0254] (2) 样本的检测结果如表12所示:

[0255] 表12检测结果

[0256]

组别	柳硫汞质量体积比	假阳性样本数	低质控荧光值	中质控荧光值	高质控荧光值
实验组 19	0.005‰	0	62843	174461	589625
实验组 20	0.006‰	0	60258	172347	595314

[0257]

实验组 21	0.007‰	0	61702	174201	586521
实验组 22	0.008‰	0	59150	175332	593541
实验组 23	0.01‰	0	60124	169875	593581
实验组 25	0.02‰	0	59589	169798	589987
实验组 26	0.03‰	0	59989	173521	588888
实验组 27	0.04‰	0	59884	170555	589997
实验组 28	0.05‰	0	59981	176541	598961
对照组 5	0%	5	617658	173470	595236
对照组 6	0.06‰	0	60879	179812	589764

[0258] 由上述结果可知,不含柳硫汞的实验缓冲液(对照组5)检测结果中包含5例假阳性样本(2.5~4.5mIU/mL),加入硫柳汞后,且使用量为0.005‰~0.06‰时,可显著降低非特异性反应,保证检测结果的准确性,不会出现假阳性结果。但在2~8℃旋紧瓶盖保存及37℃、实验室常温旋松瓶盖条件下,0.06‰柳硫汞的实验缓冲液中,出现了黑色颗粒沉淀物,不仅影响了外观,而且吸样时会导致吸嘴堵住,特别是在全自动仪器上操作时,会导致堵

针、堵管想象,增加了仪器的维护难度;如有堵针,则会导致样本空吸,引起错误的检测结果。本发明改良实验缓冲液中硫柳汞的使用量是发明人经过大量研究得出的选择,在本发明范围内(0.005‰~0.05‰)可保证改良实验缓冲液的使用效果(实验组19~28);不使用硫柳汞(对照组5)或使用量高于0.05‰(对照组6)时均会明显影响改良实验缓冲液的使用效果,导致产生假阳性结果。根据上述实验结果,柳硫汞的使用量优选0.01‰~0.03‰,更优选0.02‰。

[0259] 实施例16

[0260] 本实施例研究解离剂的选择对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响。

[0261] 一、实验设计

[0262] 为了研究不同解离剂对本发明改良实验缓冲液使用效果的影响,设置实验组29~33,具体如表13所示。各组改良实验缓冲液中,除了解离剂不一样,其他组分及组分的使用量均相同,其他组分、组分的使用量以及配置方法均同实施例1。

[0263] 表13实验设计

组别	解离剂
实验组 29	8-苯胺基萘-1-磺酸盐 0.08‰+柳硫汞 0.02‰
实验组 30	水杨酸钠 0.2‰+柳硫汞 0.02‰
实验组 31	三氯醋酸钠 0.2‰+8-苯胺基萘-1-磺酸盐 0.08‰
实验组 32	水杨酸钠 0.2‰+三氯醋酸钠 0.2‰
实验组 33	8-苯胺基萘-1-磺酸盐 0.08‰+柳硫汞 0.02‰+水杨酸钠 0.2‰

[0265] 二、实验材料

[0266] 梅毒螺旋体抗体测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)用的抗-TP校准品、抗-TP销标记物、浓缩洗液、增强液、抗-TP微孔反应板均由广州市丰华生物工程有限公司提供。利用表13中制备得到的改良实验缓冲液进行对比试验。采用二步双抗原夹心法进行检测。

[0267] 三、实验方法

[0268] 1、试剂准备

[0269] 1) 微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。

[0270] 2) 洗涤液:将“浓缩洗液”用纯化水在干净的容器中按体积比1:25倍稀释,混匀,作为工作洗涤液备用。

[0271] 3) 标记物工作液:“销标记物”与“实验缓冲液”按1:20稀释,加进洁净的一次性容器中并充分混匀稀释成工作液。

[0272] 2、试验操作

[0273] 1) 吸取100μL的“抗-TP校准品”或待测样本依次加入微孔反应板的微孔中,加贴封片。一般情况,校准品至少做2孔的复孔。

- [0274] 2) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育60min小时。
- [0275] 3) 第一步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤4次,拍干。
- [0276] 4) 向每孔中加入100 $\mu$ L已配好的标记物工作液,加贴封片。
- [0277] 5) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育60min小时。
- [0278] 6) 第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6次,拍干。
- [0279] 7) 向每孔中加入增强液100 $\mu$ L。
- [0280] 8) 微孔反应板条于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30分钟内完成检测。
- [0281] 试剂盒参考值定为:2.5mIU/mL。

#### [0282] 四、实验结果

[0283] 2655份日本富士瑞必欧株式会社TPPA法检测抗-TP试剂阴性样本,各实验组制备得到的改良实验缓冲液经对比实验检测,结果如表14所示:

[0284] 表14检测结果

[0285]

指标	实验组 29	实验组 30	实验组 31	实验组 32	实验组 33
阴性样本的 荧光值(均 数 $\pm$ 标准差)	1284.79 $\pm$ 430.20	1452.36 $\pm$ 754.36	1538.12 $\pm$ 979.34	2535.63 $\pm$ 1453.21	621.42 $\pm$ 456.23
荧光值变异 系数	33.48%	51.94%	63.67%	57.31%	73.42%
浓度值	浓度值均在 0.08 mIU/mL 以内	浓度值在 1.0~ 1.99 mIU/mL 的 有 2 份, 其他浓 度均在 1.0 mIU/mL 以内	浓度值在 1.0~ 1.99 mIU/mL 的 有 5 份; 其他浓 度均在 1.0 mIU/mL 以内	浓度值在 1.0~ 1.99 mIU/mL 的 有 7 份; 其他浓 度均在 1.0 mIU/mL 以内	浓度值在 1.0~1.99 mIU/mL 的有 2 份; 其他浓 度均在 1.0 mIU/mL 以内

[0286] 上述实验结果表明改良实验缓冲液中解离剂为“8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.08%+柳硫汞0.02%”组合(实验组29)时效果最好,优于实验组30~33。说明当解离剂选自“8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.08%+柳硫汞0.02%”时,改良缓冲液更能消除非特异性,提高精密度。含本发明其他类型解离剂的改良实验缓冲液与解离剂为“8-苯胺基萘-1-磺酸盐0.08%+柳硫汞0.02%”的改良实验缓冲液检测效果对比实验结果与本实施例类似,具体数据省略。

[0287] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

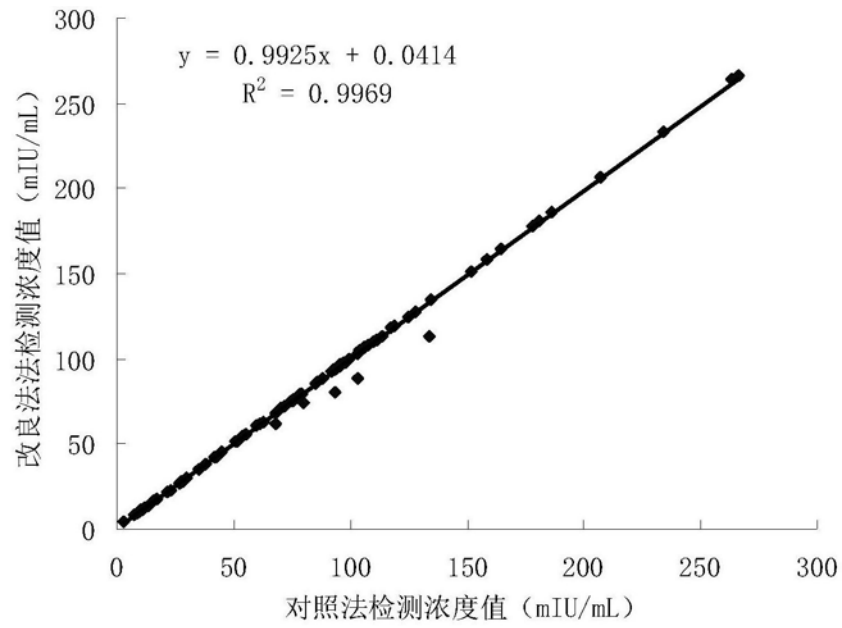


图1

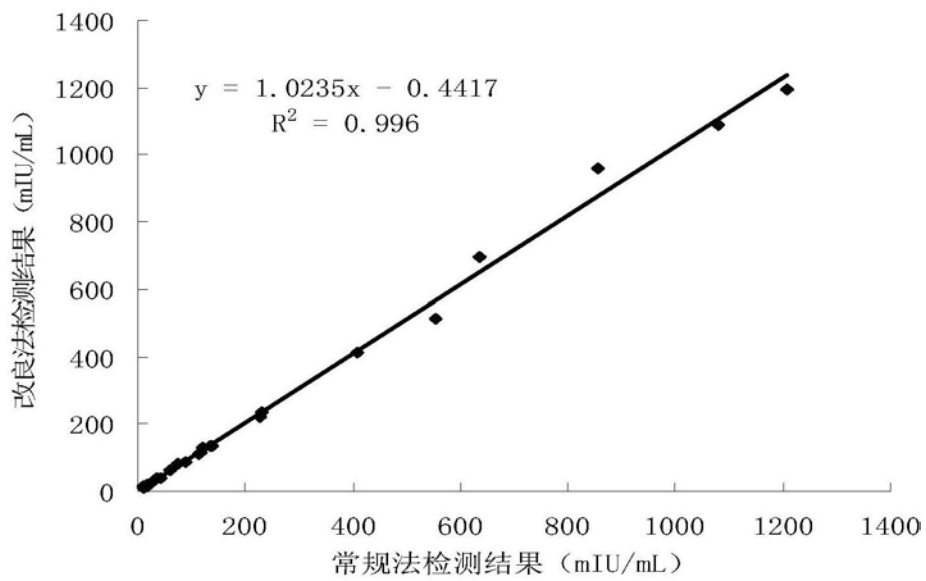


图2

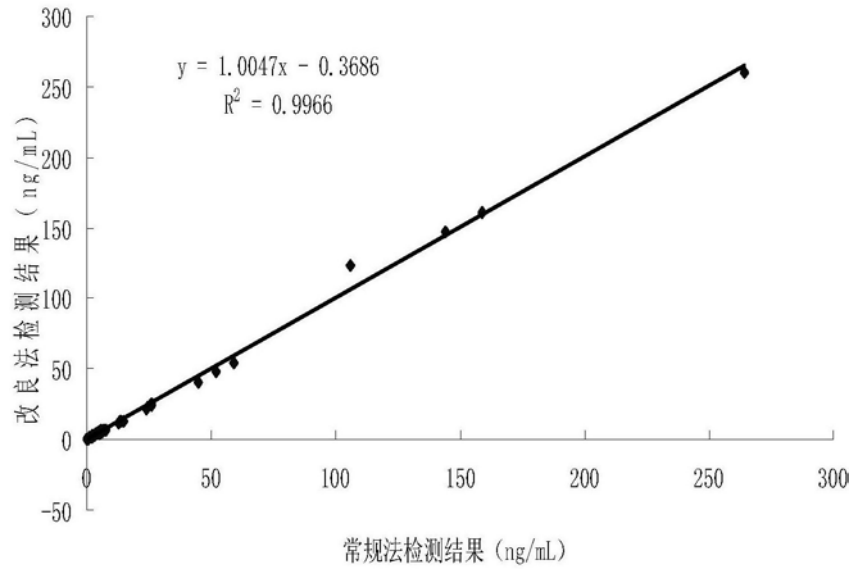


图3

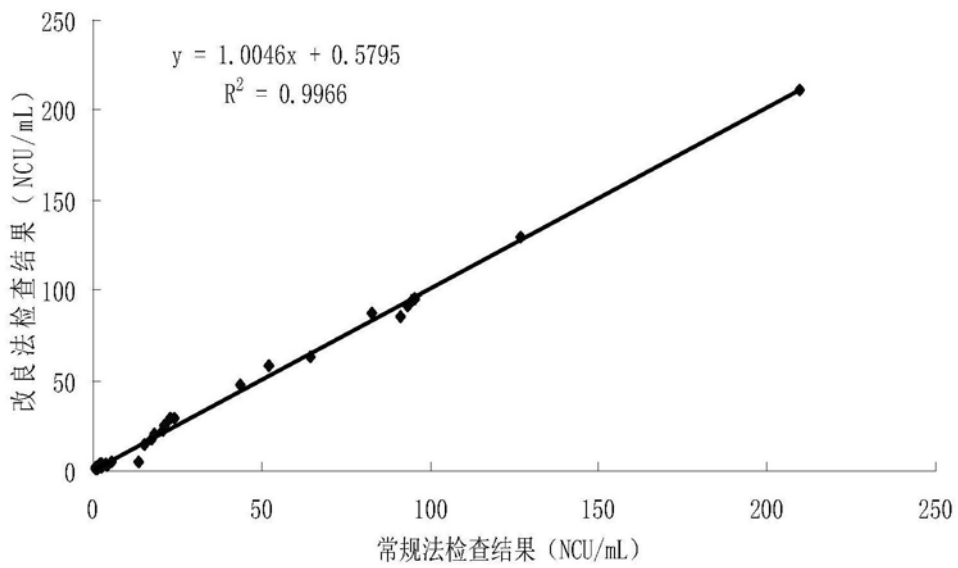


图4

专利名称(译)	一种改良实验缓冲液及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108490166A</a>	公开(公告)日	2018-09-04
申请号	CN201810170146.9	申请日	2018-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
[标]发明人	谭玉华 刘灿 赵凡一 毛静宜		
发明人	谭玉华 刘灿 赵凡一 毛静宜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/576 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/5761 G01N33/5764 G01N33/6893		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种改良实验缓冲液，包含以下组分：基础实验缓冲液、氯化钠和解离剂；所述解离剂选自8-苯胺基萘-1-磺酸盐、柳硫汞、水杨酸钠和三氯醋酸钠中的至少一种。同时，本发明还公开了所述改良实验缓冲液的应用。本发明提供的改良实验缓冲液可有效降低静电力，促进非特异性免疫反应或非特异吸附的低亲和力蛋白质配体发生溶解解离，降低了抗原抗体的非特异性结合，同时在解离剂的作用下可促进发生非特异性免疫反应或非特异吸附的蛋白质配体解离，从而降低免疫分析非特异性反应，提高了检测分辨率、准确性和精密度。

