



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374902 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811166756.8

(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 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

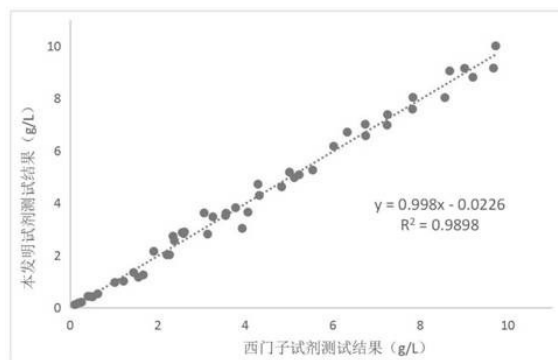
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明属于临床医学诊断领域,特别涉及一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒及其制备方法。该试剂盒包含R1试剂和R2试剂、IgG4质控品和IgG4校准品组成。所述的R1试剂是包含有多聚物的缓冲液。所述的R2试剂是包含包被IgG4抗体的聚苯乙烯乳胶微球溶液。测定时,样本中IgG4和聚苯乙烯乳胶微球上包被的IgG4单克隆抗体产生特异性免疫反应,乳胶通过免疫反应形成不溶性的免疫颗粒复合物,胶乳的粒径发生改变引起浊度明显变化。浊度变化与样本中IgG4的含量成正相关。从用已知浓度的校品准做出标准曲线,可以算出样本中IgG4的浓度。本发明提供的测定方法,使用的样本量少,与其它方法相比,具有简单、准确、快速的特点,并可直接在全自动分析仪上实现高通量检测分析。



1. 一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括R1试剂、R2试剂、IgG4蛋白质控品、IgG4蛋白校准品;

所述的R1试剂包括缓冲液、电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂;

所述的R2试剂包括包被有IgG4抗体的乳胶微球、缓冲液、稳定剂、电解质、防腐剂;

所述的IgG4蛋白质控品包括IgG4质控品蛋白和稀释液;

所述的IgG4蛋白校准品包括IgG4校准品蛋白和稀释液。

2. 根据权利要求1所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:所述的乳胶微球是含有聚苯乙烯的多聚物,表面含有羧基基团,粒径在50-200nm之间;

所述的IgG4抗体是通过化学交联的方法偶联到乳胶微球表面的,所述的化学交联方法是通过化学交联剂在交联缓冲液中进行的。

3. 根据权利要求2所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:所述化学交联剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羧基琥珀酰亚胺、N-羧基硫代琥珀酰亚胺中的一种或两种以上混合物;

所述的交联缓冲液为不含氨基的MES缓冲液、PBS缓冲液、HEPES缓冲液中的一种,缓冲液pH值为5.0-8.0。

4. 根据权利要求1所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:稀释液包含缓冲液、稳定剂、电解质、防腐剂。

5. 根据权利要求1所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:所述的IgG4校准品是高浓度单点校准品或使用稀释液梯度稀释,直接制备出不同浓度的校准品,浓度为0-10.0g/L。

6. 根据权利要求1所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:所述的IgG4质控品是高浓度单点质控品或使用稀释液梯度稀释,直接制备出不同浓度的质控品,浓度为0.05-5.0g/L。

7. 根据权利要求1或者4所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:所述电解质为氯化钠、氯化钾、磷酸氢钠、磷酸二氢钠中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.1%-2%之间;

所述的稳定剂为酪蛋白、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇、蔗糖、葡聚糖中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.05%-1.0%之间;

所述的表面活性剂为吐温-20、曲拉通-100、聚醚中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.01%-0.5%之间;

所述的防腐剂为叠氮钠、对羟基苯甲酸、Proclin300中一种,浓度在0.05%-0.1%之间。

8. 根据权利要求7所述的定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于:所述的电解质为氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,所述的稳定剂是牛血清白蛋白和明胶,所述的表面活性剂是曲拉通-100。

9. 一种制备定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊检测试剂盒的方法,包括如下步骤:

(1) R1试剂的制备:

R1试剂包括pH为6.5-8.5的50mmol PBS缓冲液,0-5%的PEG10000,0.02%-0.1%的表面活性剂,0.02%-0.2%的防腐剂;

(2) R2试剂的制备:

将含有羧基的乳胶微球加入到50-200mmol, pH5.0-6.0的MES缓冲液, 或者100-200mmol, pH6.5-7.5的PBS缓冲液中, 使乳胶微球的浓度为0.1%-2.0%, 加入EDC和NHS, EDC的浓度为0.02%-0.1%, NHS的浓度为0.05%-0.2%, 室温搅拌10-15分钟, 离心弃去上清, 用100-200mmol, pH6.5-7.5的缓冲液复溶, 复溶后的乳胶微球浓度为0.05%-0.5%;

取IgG4抗体, 加入到活化的乳胶微球溶液中, 加入抗体量与乳胶微球质量比为: 10mg乳胶: 0.5-2.0mg抗体;

将乳胶微球和IgG4抗体充分混匀, 室温孵育反应2-4小时, 加入5%的牛血清白蛋白溶液, 室温孵育反应1-2小时, 离心, 弃去上清, 用PBS缓冲液复溶, 再次离心, 弃去上清, 用乳胶微球保存液(50-200mmol的PBS缓冲液, 含防腐剂0.05%-0.1%, 稳定剂0.1%-0.5%)复溶, 使乳胶微球的浓度为0.05%-0.2%, 即为R2试剂;

(3) 稀释液的制备:

取0.1%-2%的电解质, 0.05%-1.0%稳定剂, 0.01%-0.5%表面活性剂, 0.05%-0.1%防腐剂, 加入到100mmol的缓冲液中, 即为稀释液;

(4) 校准品的制备:

从国内知名生物公司购买IgG4校准品抗原蛋白, 用稀释液配制成不同梯度浓度的校准品, 校准品浓度: 0g/L、0.05g/L、0.5g/L、1.0g/L、5.0g/L、10.0g/L;

(5) 质控品的制备:

从国内知名生物公司购买IgG4质控品抗原蛋白, 用稀释液配制成不同梯度浓度的质控品, 质控品浓度: 0.05g/L、0.5g/L、5.0g/L。

一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术免疫检测领域,具体涉及一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒及其制备方法。

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,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;免疫层析胶体金法(中国发明专利CN103837686A,一种检测人免疫球蛋白G4的试剂盒及其制备),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。

[0004] 胶乳颗粒增强比浊法是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测技术。具体原理是在高分子胶乳微球的表面交联或物理吸附抗体(单抗或者多抗),当交联有抗体的微球(一般称为Reagent 2或者R2)在试剂反应液中(一般称为Reagent 1或者R1)与抗原结合后,在短时间内会迅速聚集在一起,形成浊度,从而改变反应液的散光性能或透光性能,在线性范围内可以反映被测抗原的浓度。其优点是抗原、抗体反应后,直接测定反应液的吸光度值,省却了ELISA法反复孵育和洗板等烦琐操作步骤,几分钟就能获得结果。此外,全自动免疫比浊法操作步骤的简化也相应地避免了许多人为操作因素和试剂、环境等外界因素的干扰,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的含量。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒,该试剂盒具有检测简单,准确,快速的特点,并可在全自动分析仪上批量分析实现高通量检测。

[0006] 本发明还提供了定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明还提供了IgG4的检测方法。

[0008] 为实现以上技术效果,本发明通过如下步骤实现:

[0009] 一种定量检测IgG4的乳胶比浊免疫试剂盒,该试剂盒包括R1试剂、R2试剂、IgG4蛋白质控品、IgG4蛋白校准品;所述的R1试剂包括缓冲液、电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂;述的R2试剂包括包被有IgG4抗体的乳胶微球、缓冲液、稳定剂、电解质、防腐剂;所述的IgG4蛋白质控品包括IgG4质控品蛋白和稀释液;所述的IgG4蛋白校准品包括IgG4校准品蛋

白和稀释液。

[0010] 所述的乳胶微球是含有聚苯乙烯的多聚物,表面含有羧基基团,粒径在50-200nm,所述的IgG4抗体是通过化学交联的方法偶联到乳胶微球表面的,所述的化学交联的方法是通过化学交联剂在交联缓冲液中进行的。

[0011] 所述化学交联剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、中的一种或两种以上混合物;所述的交联缓冲液为不含氨基的MES缓冲液、PBS缓冲液、HEPES缓冲液中的一种,缓冲液pH值为5.0-8.0。

[0012] 所述的稀释液包含缓冲液、稳定剂、电解质、防腐剂。

[0013] 所述的IgG4校准品是高浓度单点校准品或使用稀释液梯度稀释,直接制备出不同浓度的校准品,浓度为0-10.0g/L。

[0014] 所述的IgG4质控品是高浓度单点质控品或使用稀释液梯度稀释,直接制备出不同浓度的质控品,浓度为0.05-5.0g/L。

[0015] 所述电解质为氯化钠、氯化钾、磷酸氢钠、磷酸二氢钠中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.1%-2%之间;所述的稳定剂为酪蛋白、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇、蔗糖、葡聚糖中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.05%-1.0%之间;所述的表面活性剂为吐温-20、曲拉通-100、聚醚中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.01%-0.5%之间;所述的防腐剂为叠氮钠、对羟基苯甲酸、Proclin300中一种,浓度在0.05%-0.1%之间。

[0016] 优选的,所述的电解质为氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。

[0017] 优选的,所述的稳定剂是牛血清白蛋白和明胶。

[0018] 优选的,所述的表面活性剂是曲拉通-100。

[0019] 所述试剂盒的制备:

[0020] (1) R1试剂的制备:

[0021] R1试剂包括pH为6.5-8.5的50mmol PBS缓冲液,0-5%的PEG10000,0.02%-0.1%的表面活性剂,0.02%-0.2%的防腐剂;

[0022] (2) R2试剂的制备:

[0023] 将含有羧基的乳胶微球加入到50-200mmol, pH5.0-6.0的MES缓冲液,或者100-200mmol, pH6.5-7.5的PBS缓冲液中,使乳胶微球的浓度为0.1%-2.0%,加入EDC和NHS,EDC的浓度为0.02%-0.1%,NHS的浓度为0.05%-0.2%,室温搅拌10-15分钟,离心弃去上清,用100-200mmol, pH6.5-7.5的缓冲液复溶,复溶后的乳胶微球浓度为0.05%-0.5%;取IgG4抗体,加入到活化的乳胶微球溶液中,加入抗体量与乳胶微球质量比为:10mg乳胶:0.5-2.0mg抗体;将乳胶微球和IgG4抗体充分混匀,室温孵育反应2-4小时,加入5%的牛血清白蛋白溶液,室温孵育反应1-2小时,离心,弃去上清,用PBS缓冲液复溶,再次离心,弃去上清,用乳胶微球保存液(50-200mmol的PBS缓冲液,含防腐剂0.05%-0.1%,稳定剂0.1%-0.5%)复溶,使乳胶微球的浓度为0.05%-0.2%,即为R2试剂;

[0024] (3) 稀释液的制备:

[0025] 取0.1%-2%的电解质,0.05%-1.0%稳定剂,0.01%-0.5%表面活性剂,0.05%-0.1%防腐剂,加入到100mmol的缓冲液中,即为稀释液;

[0026] (4) 校准品的制备:

[0027] 从国内知名生物公司购买IgG4校准品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的

校准品,校准品浓度:0g/L、0.05g/L、0.5g/L、1.0g/L、5.0g/L、10.0g/L;

[0028] (5) 质控品的制备:

[0029] 从国内知名生物公司购买IgG4质控品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的质控品,质控品浓度:0.05g/L、0.5g/L、5.0g/L。

[0030] 与现有技术相比,本发明有以下有益效果:

[0031] ①本发明公布的专利为一种定量检测IgG4乳胶增强免疫比浊试剂盒,目前国内还是空白,药监局还没有批文产品。

[0032] ②本发明方法使用的样本量少,与其他检测方法相比较,具有简单、准确、快速的特点,并可直接在全自动分析仪上批量分析实现高通量。

附图说明

[0033] 附图是用于提供对本发明公开的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本发明,但并不构成对本发明的制约。在附图中:

[0034] 图1是(实施例1) IgG4检测的定标曲线;

[0035] 图2是(实施例2) IgG4检测的定标曲线;

[0036] 图3是(实施例3) IgG4检测的定标曲线;

[0037] 图4是本发明试剂与西门子试剂测试临床样本结果相关性分析图。

具体实施方式

[0038] 以下实施例虽然对本发明的设计思路作了比较详细的文字描述,但是这些文字描述,只是对本发明设计思路的简单文字描述,而不是对本发明设计思路的限制,任何不超出本发明设计思路的组合、增加或修改,均落入到本发明的保护范围内。

[0039] 实施例1:

[0040] (1) R1试剂的制备:

[0041] 称取100ml的pH为7.2的50mmol PBS缓冲液,加入1.0g的PEG10000,溶解后加入50ul的Tween-20,100ul的Proclin300,搅拌充分混匀。

[0042] (2) R2试剂的制备:

[0043] 将100mg含有羧基的乳胶微球加入到1ml的100mmol, pH5.0-6.0的MES缓冲液中,混合均匀,加入20ul的EDC (10mg/ml) 和50ul的NHS (10mg/ml),混匀后室温搅拌10-15分钟,离心弃去上清,用1ml的100mmol, pH7.5的PBS缓冲液复溶。

[0044] 加入5mg的IgG4抗体,充分混匀,室温孵育反应2小时,加入5%的牛血清白蛋白溶液100ul,室温孵育反应1小时,离心,弃去上清,用1ml的PBS缓冲液复溶,再次离心,弃去上清,用10ml的乳胶微球保存液(50mmol的PBS缓冲液,含防腐剂0.05%-0.1%,稳定剂0.1%-0.5%)复溶,即为R2试剂。

[0045] (3) 稀释液的制备:

[0046] 称取纯化水100ml,加入氯化钠0.8g,磷酸二氢钠2.9g,磷酸氢二钠0.2g,搅拌溶解,调节pH为7.2。再加入0.5g的酪蛋白,溶解后加入100ul的吐温20,50ul的Proclin300,混合均匀,即为稀释液。

[0047] (4) 校准品的制备:

[0048] 从国内知名生物公司购买IgG4校准品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的校准品,校准品浓度:0g/L、0.05g/L、0.5g/L、1.0g/L、5.0g/L、10.0g/L、

[0049] (5) 质控品的制备:

[0050] 从国内知名生物公司购买IgG4质控品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的质控品,质控品浓度:0.05g/L、0.5g/L、5.0g/L。

[0051] 实施例2:

[0052] (1) R1试剂的制备:

[0053] 称取100ml的pH为7.2的50mmol PBS缓冲液,加入1.5g的PEG10000,溶解后加入50ul的Tween-20,100ul的Proclin300,搅拌充分混匀。

[0054] (2) R2试剂的制备:

[0055] 将100mg含有羧基的乳胶微球加入到1ml的100mmol, pH5.0-6.0的MES缓冲液中,混合均匀,加入20ul的EDC (10mg/ml) 和50ul的NHS (10mg/ml),混匀后室温搅拌10-15分钟,离心弃去上清,用1ml的100mmol, pH7.5的PBS缓冲液复溶。

[0056] 加入10mg的IgG4抗体,充分混匀,室温孵育反应2小时,加入5%的牛血清白蛋白溶液100ul,室温孵育反应1小时,离心,弃去上清,用1ml的PBS缓冲液复溶,再次离心,弃去上清,用10ml的乳胶微球保存液 (50mmol的PBS缓冲液,含防腐剂0.05%-0.1%,稳定剂0.1%-0.5%) 复溶,即为R2试剂。

[0057] (3) 稀释液的制备:

[0058] 称取纯化水100ml,加入氯化钠0.8g,磷酸二氢钠2.9g,磷酸氢二钠0.2g,搅拌溶解,调节pH为7.2。再加入0.5g的酪蛋白,溶解后加入100ul的曲拉通100,50ul的Proclin300,混合均匀,即为稀释液。

[0059] (4) 校准品的制备:

[0060] 从国内知名生物公司购买IgG4校准品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的校准品,校准品浓度:0g/L、0.05g/L、0.5g/L、1.0g/L、5.0g/L、10.0g/L、

[0061] (5) 质控品的制备:

[0062] 从国内知名生物公司购买IgG4质控品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的质控品,质控品浓度:0.05g/L、0.5g/L、5.0g/L。

[0063] 实施例3:

[0064] (1) R1试剂的制备:

[0065] 称取100ml的pH为7.2的50mmol PBS缓冲液,加入1.0g的PEG10000,溶解后加入100ul的Tween-20,100ul的Proclin300,搅拌充分混匀。

[0066] (2) R2试剂的制备:

[0067] 将100mg含有羧基的乳胶微球加入到1ml的100mmol, pH5.0-6.0的MES缓冲液中,混合均匀,加入20ul的EDC (10mg/ml) 和50ul的NHS (10mg/ml),混匀后室温搅拌10-15分钟,离心弃去上清,用1ml的100mmol, pH7.5的HEPES缓冲液复溶。

[0068] 加入5mg的IgG4抗体,充分混匀,室温孵育反应2小时,加入5%的牛血清白蛋白溶液100ul,室温孵育反应1小时,离心,弃去上清,用1ml的PBS缓冲液复溶,再次离心,弃去上清,用10ml的乳胶微球保存液 (50mmol的PBS缓冲液,含防腐剂0.05%-0.1%,稳定剂0.1%-0.5%) 复溶,即为R2试剂。

[0069] (3) 稀释液的制备:

[0070] 称取纯化水100ml,加入氯化钠0.8g,磷酸二氢钠2.9g,磷酸氢二钠0.2g,搅拌溶解,调节pH为7.2。再加入0.25g的酪蛋白,溶解后加入100ul的吐温-20,50ul的Proclin300,混合均匀,即为稀释液。

[0071] (4) 校准品的制备:

[0072] 从国内知名生物公司购买IgG4校准品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的校准品,校准品浓度:0g/L、0.05g/L、0.5g/L、1.0g/L、5.0g/L、10.0g/L、

[0073] (5) 质控品的制备:

[0074] 从国内知名生物公司购买IgG4质控品抗原蛋白,用稀释液配制成不同梯度浓度的质控品,质控品浓度:0.05g/L、0.5g/L、5.0g/L。

[0075] 实施例4:标准曲线的制备

[0076] 取实施例1中5ul的各浓度校准品溶液,R1试剂200ul,R2试剂40ul,使用Beckman公司IMMAGE 800全自动特定蛋白分析仪进行测定,制备标准曲线,检测结果如下表所示,(具体如图1)。

[0077]

校准品 (g/L)	响应量
0	1.523
0.05	15.2
0.50	140
1.00	232
5.00	896
10.0	2097

[0078] 实施案例5:标准曲线的制备

[0079] 取实施例2中5ul的各浓度校准品溶液,R1试剂200ul,R2试剂40ul,使用Beckman公司IMMAGE 800全自动特定蛋白分析仪进行测定,制备标准曲线,检测结果如下表所示,(具体如图2)。

[0080]

校准品 (g/L)	响应量
0	3.014
0.05	20.7
0.50	152
1.0	243
5.0	993
10.0	2282

[0081] 实施案例6:标准曲线的制备

[0082] 取实施例3中5ul的各浓度校准品溶液,R1试剂200ul,R2试剂40ul,使用Beckman公司IMMAGE 800全自动特定蛋白分析仪进行测定,制备标准曲线,检测结果如下表所示,(具体如图3)

[0083]

校准品 (g/L)	响应量
0	1.858
0.05	16.2
0.50	128
1.00	226
5.00	843
10.0	1994

[0084] 实施案例7:最低检出限的检测(分析灵敏度)

[0085] 以空白(校准品稀释液)作为样本进行测试,重复测试10次,计算空白响应量的均值(M)和标准差(SD),将(M+2SD)代入拟合的标准曲线,计算浓度结果。测定结果见下表:

#	实施例 1 试剂	实施例 2 试剂	实施例 3 试剂
1	1.933	3.013	1.985
2	1.652	3.156	2.181
3	1.588	2.801	1.614
4	1.765	3.084	1.857
5	1.604	2.704	1.844
6	1.861	2.997	1.993
7	1.695	2.784	2.102
8	1.979	3.019	1.754
9	1.827	2.812	1.896
10	1.759	3.105	1.873
均值 M	1.7663	2.9475	1.9099
标准差 SD	0.1273	0.1499	0.1560
M+2SD	2.021	3.247	2.222
检出限 (g/L)	0.0024	0.0034	0.0053

[0088] 实施案例8:重复性的检测

[0089] 用0.05g/L,0.5g/L的企业质控品作为样本进行测试,每个浓度的样本重复测试10次,计算10次测试结果的均值(M)和标准差(SD),并计算其变异系数(CV%)。

[0090] 变异系数计算公式: $CV(\%) = \frac{SD}{M} \times 100\%$

[0091] 测定结果见下表:

#	实施例 1 试剂		实施例 2 试剂		实施例 3 试剂	
	0.05g/L	0.5g/L	0.05g/L	0.5g/L	0.05g/L	0.5g/L
1	0.053	0.493	0.051	0.523	0.047	0.513
2	0.049	0.501	0.048	0.521	0.052	0.512
3	0.047	0.489	0.051	0.494	0.051	0.495
4	0.052	0.497	0.050	0.479	0.049	0.517
5	0.050	0.512	0.049	0.471	0.052	0.524
[0092] 6	0.049	0.462	0.052	0.489	0.049	0.501
7	0.051	0.533	0.054	0.496	0.050	0.486
8	0.046	0.497	0.049	0.502	0.052	0.489
9	0.048	0.479	0.054	0.497	0.049	0.506
10	0.051	0.511	0.047	0.496	0.048	0.502
均值 M	0.050	0.49742	0.0505	0.49682	0.0499	0.50452
标准差 SD	0.0021	0.0183	0.0022	0.0154	0.0017	0.0117
CV (%)	4.25%	3.68%	4.45%	3.09%	3.41%	2.31%

[0093] 实施案例9:批间差的考核

[0094] 取3个批号的试剂,分别用0.5g/L的企业质控品作样品进行测试,重复测试10次,计算30个测定结果的均值和标准差(SD),并计算其变异系数(CV%)。测试数据如下表所示。

#	第 1 批	第 2 批	第 3 批
1	0.497	0.513	0.487
2	0.511	0.491	0.512
[0095] 3	0.498	0.497	0.520
4	0.487	0.489	0.476
5	0.507	0.501	0.494
6	0.498	0.502	0.487
7	0.523	0.512	0.507
8	0.517	0.486	0.478
[0096] 9	0.509	0.495	0.519
10	0.501	0.463	0.474
均值 M	0.498		
标准差 SD	0.0148		
变异系数 CV	2.97%		

[0097] 实施案例10:准确度测试

[0098] 配制三个回收样本:用IgG4蛋白配制成浓度为5g/l和50g/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50g/l的IgG4蛋白溶液。配制成3个回收样本,在Beckman公司的IMMAGE800全自动特定蛋白分析仪上进行测试。根据公式:回收率=回收浓度÷加入浓度×100%,计算样本的回收率。测试数据如下表所示。

[0099]

	测定浓度g/l	加入浓度g/l	回收浓度g/l	回收率%
回收样本1	0.142	--	--	--
回收样本2	0.608	0.4545	0.466	103%
回收样本3	4.597	4.5454	4.455	98%

[0100] 平均回收率(%) = (103%+98%) ÷ 2 = 100.27%

[0101] 其中:回收样本2中的加入浓度 = $5 * (0.1 / (0.1 + 1)) = 0.4545$ (g/l) ,[0102] 回收样本3中的加入浓度 = $50 * (0.1 / (0.1 + 1)) = 4.545$ (g/l) 。

[0103] 实施案例11:检测临床样本

[0104] 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),用本发明的试剂在Beckman公司IMMAGE800全自动特定蛋白分析仪上进行对比测试。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。测试结果如下表所示。

[0105]

样本#	西门子试剂 (g/l)	本发明试剂 (g/l)	样本#	西门子试剂 (g/l)	本发明试剂 (g/l)
1	0.408	0.431	26	7.82	7.59
2	2.56	2.87	27	6.75	6.57
3	3.14	2.81	28	7.83	8.04
4	2.59	2.83	29	0.512	0.411
5	9.2	8.81	30	7.24	6.98
6	5.23	5.08	31	0.109	0.112
7	2.27	2.02	32	2.61	2.89
8	2.35	2.73	33	0.189	0.173
9	8.67	9.05	34	3.55	3.52
10	9.72	10.01	35	1.67	1.25
11	1.45	1.34	36	4.06	3.65
12	5.01	5.18	37	3.26	3.47
13	4.32	4.29	38	1.02	0.96
14	9.67	9.16	39	2.38	2.56

[0106]

15	3.93	3.03	40	6.74	7.01
16	6.33	6.71	41	5.54	5.26
17	3.56	3.61	42	6.02	6.17
18	5.12	4.97	43	4.29	4.72
19	0.632	0.526	44	8.56	8.03
20	1.22	1.01	45	9.01	9.15
21	3.06	3.62	46	7.25	7.38
22	4.83	4.62	47	3.78	3.82
23	1.91	2.15	48	2.21	2.02
24	0.243	0.195	49	1.56	1.16
25	0.476	0.423	50	0.259	0.206

[0107] 以西门子特定蛋白分析仪试剂的测试结果为横坐标,本发明试剂的测量值为纵坐标绘制散点图(见图4)。两组结果的相关性 $R^2=0.9898$ 。

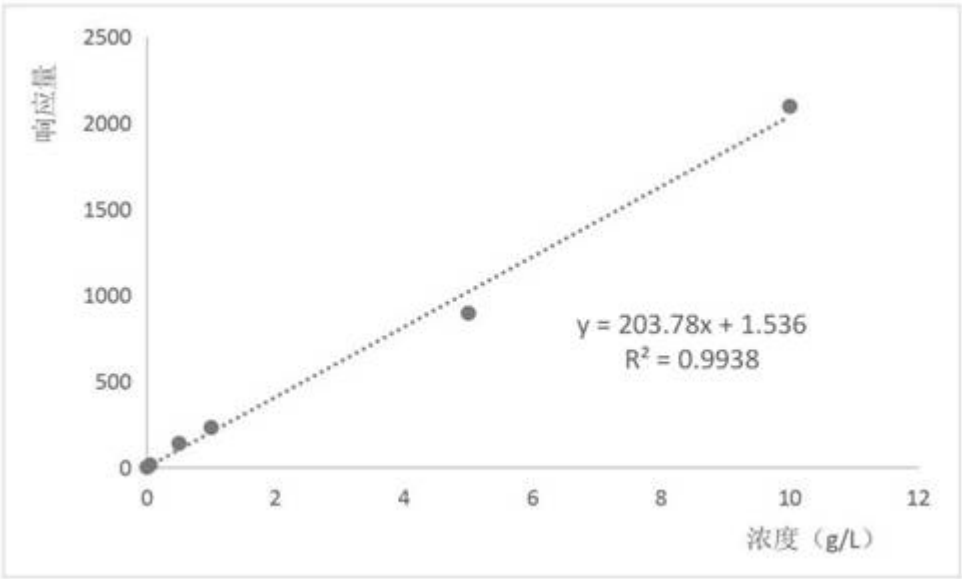


图1

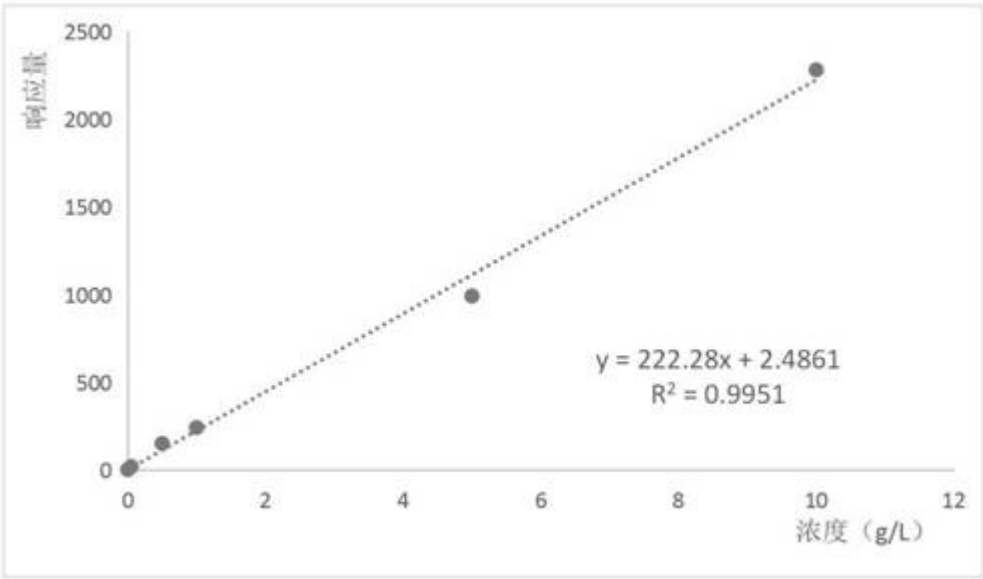


图2

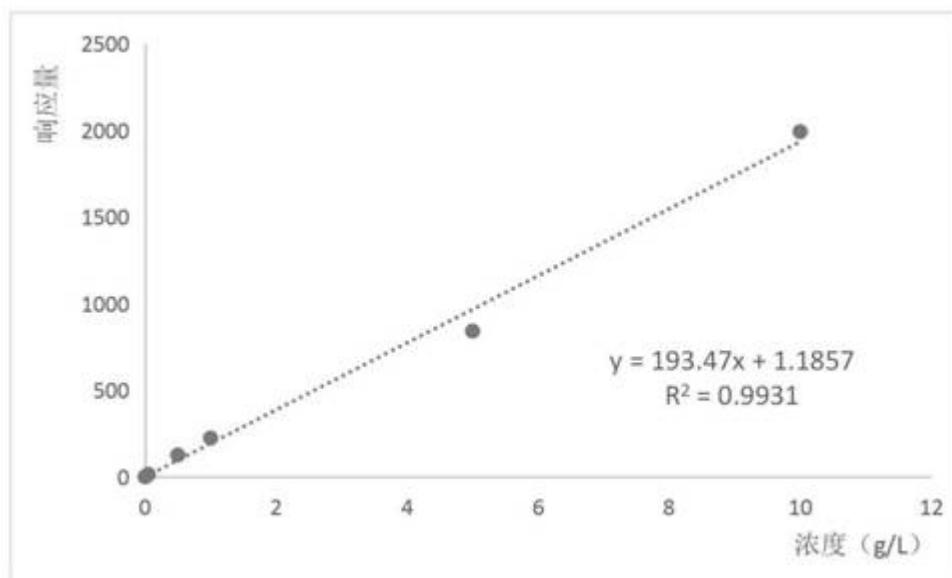


图3

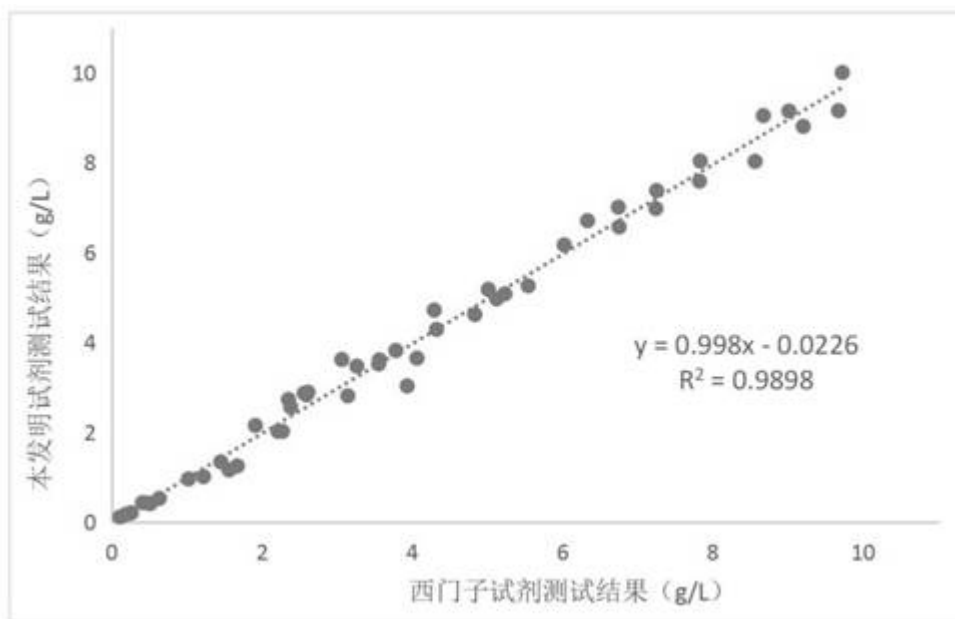


图4

专利名称(译)	一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109374902A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201811166756.8	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 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/531 G01N33/54313		
代理人(译)	龙涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床医学诊断领域，特别涉及一种定量检测IgG4的乳胶增强免疫比浊试剂盒及其制备方法。该试剂盒包含R1试剂和R2试剂、IgG4质控品和IgG4校准品组成。所述的R1试剂是包含有多聚物的缓冲液。所述的R2试剂是包含包被IgG4抗体的聚苯乙烯乳胶微球溶液。测定时，样本中IgG4和聚苯乙烯乳胶微球上包被的IgG4单克隆抗体产生特异性免疫反应，乳胶通过免疫反应形成不溶性的免疫颗粒复合物，胶乳的粒径发生改变引起浊度明显变化。浊度变化与样本中IgG4的含量成正相关。从用已知浓度的校品准做出标准曲线，可以算出样本中IgG4的浓度。本发明提供的测定方法，使用的样本量少，与其它方法相比，具有简单、准确、快速的特点，并可直接在全自动分析仪上实现高通量检测分析。

