



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106501528 A

(43)申请公布日 2017. 03. 15

(21)申请号 201610951274.8

(22)申请日 2016.10.27

(71)申请人 杭州量康科技有限公司

地址 310053 浙江省杭州市滨江区滨安路
688号D座4层

(72)发明人 陈姗姗 骆亦奇 余国良

(74)专利代理机构 北京华进京联知识产权代理
有限公司 11606

代理人 马敬

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

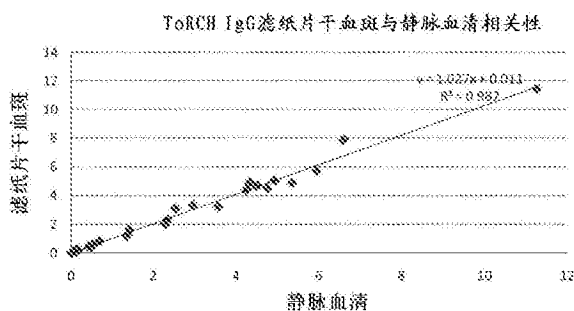
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法,其中,所述方法包括以下步骤:从滤纸片干血斑取得直径为2-4mm的血片;将血片采用样本稀释液复溶,制得复溶样品;复溶样品采用流式荧光发光法测定。上述基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法,采用干全血滤纸法结合流式荧光发光法测定IgG抗体或IgM抗体,解决了现有检测方法中需样本量较多的问题,减少了需要的样本量,对人体损伤小,样本便于保存和运输,特别是针对采用对象是新生儿时,无需静脉采血,采样更加方便。



1. 一种基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

从滤纸片干血斑取得直径为2-4mm的血片;

将血片采用样本稀释液复溶,制得复溶样品;

复溶样品采用流式荧光发光法测定。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述样本稀释液为包括羊抗人IgG抗体或牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述血片采用样本稀释液复溶是将血片置于离心管中,向离心管中加入所述样本稀释液,室温震荡0.5-2h复溶,制得复溶样品。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述血片为4-8片,所述加入的样本稀释液为100-200 μ L。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述血片为4片,所述加入的样本稀释液为100 μ L。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述流式荧光发光法包括以下步骤:

步骤1:将所述复溶样品与磁性微球悬液混合,使复溶样品中的特异性IgG抗体或IgM抗体分别结合到交联有与所述IgG抗体或IgM抗体对应抗原的磁性微球上,洗涤去除反应后的剩余液体,制得磁性微球-抗原-抗体复合物;

步骤2:将藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体加入步骤1制备的磁性微球-抗原-抗体复合物中,洗涤去除反应后的剩余液体,制得磁性微球-抗原-抗体-藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体复合物;

步骤3:将磁性微球重悬液加入步骤2制备的磁性微球-抗原-抗体-藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体复合物中,采用多功能流式分析仪检测。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述步骤1为:

在96孔反应板上各孔加入50 μ L/孔的磁性微球悬液;

在96孔反应板上各孔中分别加入10 μ L/孔的对照品、阴性质控品、阳性质控品以及复溶样品;

加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30min;

取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔的洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,以除去反应残留物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述步骤2为:

在所述步骤1处理后的96孔反应板的各孔分别加入50 μ L/孔的藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体溶液,加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30min;

取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,以去除反应残留物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述步骤3为:

在所述步骤2处理后的96孔反应板的各孔分别加入150 μ L/孔的磁性微球重悬液,充分振荡,使磁性微球悬浮;将96孔反应板在多功能流式分析仪上测试。

基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体检测方法领域,特别是涉及一种基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法。

背景技术

[0002] ToRCH一词是美国学者Nahmias于1971年提出的,由多种引起宫内感染的微生物和病毒的英文名称首字母组成。其中To代表刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*,Tox),R代表风疹病毒(*Rubella Virus*,Rub),C代表巨细胞病毒(*Cytomegalovirus*,CMV),H代表单纯疱疹病毒1型和2型(*Herpes Simplex Virus 1 and 2*,HSV1/2)。ToRCH感染是宫内感染的重要危险因素,孕妇被感染其中一种或多种病原体后,可通过胎盘传播给胎儿或通过产道引起围产期感染,导致流产、死胎、早产、先天畸形和智力障碍等不良结局,在围产医学中称为ToRCH综合症。

[0003] 在免疫分析方法中,由于全血中的过氧化物酶、凝血因子等成分对于检测结果有影响,传统的均采用血清进行免疫分析检测。

[0004] 目前,国际上公认的较为准确的ToRCH检测方法是测定人体血清中的特异性IgG、IgM抗体,以判断受感染的情况。检测方法有酶联免疫法、化学发光法等分析检测技术。

[0005] 然而上述方法需要最终测定血清样本,因此需要采集较多的全血样本用于制备血清样本,当检测人群为新生儿时会较难采集血清或全血样本。另外还存在样本不易保存或运输的问题。

发明内容

[0006] 基于此,有必要针对检测ToRCH10项抗体时样本用量多以及样本不易保存或运输的问题,提供一种基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法。

[0007] 本发明提供一种基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

[0008] 从滤纸片干血斑取得直径为2-4mm的血片;

[0009] 将血片采用样本稀释液复溶,制得复溶样品;

[0010] 复溶样品采用流式荧光发光法测定。

[0011] 在其中的一个实施例中,所述样本稀释液为包括羊抗人IgG抗体或牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液。

[0012] 在其中的一个实施例中,所述血片采用样本稀释液复溶是将血片置于离心管中,向离心管中加入所述样本稀释液,室温震荡0.5-2h复溶,制得复溶样品。

[0013] 在其中的一个实施例中,所述血片为4-8片,所述加入的样本稀释液为100-200μL。

[0014] 在其中的一个实施例中,所述血片为4片,所述加入的样本稀释液为100μL。

[0015] 在其中的一个实施例中,所述流式荧光发光法包括以下步骤:

[0016] 步骤1:将所述复溶样品与磁性微球悬液混合,使复溶样品中的特异性IgG抗体或

IgM抗体分别结合到交联有与所述IgG抗体或IgM抗体对应抗原的磁性微球上,洗涤去除反应后的剩余液体,制得磁性微球-抗原-抗体复合物;

[0017] 步骤2:将藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体加入步骤1制备的磁性微球-抗原-抗体复合物中,洗涤去除反应后的剩余液体,制得磁性微球-抗原-抗体-藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体复合物;

[0018] 步骤3:将磁性微球重悬液加入步骤2制备的磁性微球-抗原-抗体-藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体复合物中,采用多功能流式分析仪检测。

[0019] 在其中的一个实施例中,所述步骤1为:

[0020] 在96孔反应板上各孔加入50 μ L/孔的磁性微球悬液;

[0021] 在96孔反应板上各孔中分别加入10 μ L/孔的对照品、阴性质控品、阳性质控品以及复溶样品;

[0022] 加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30min;

[0023] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔的洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,以除去反应残留物。

[0024] 在其中的一个实施例中,所述步骤2为:

[0025] 在所述步骤1处理后的96孔反应板的各孔分别加入50 μ L/孔的藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体溶液,加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30min;

[0026] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,以去除反应残留物。

[0027] 在其中的一个实施例中,所述步骤3为:

[0028] 在所述步骤2处理后的96孔反应板的各孔分别加入150 μ L/孔的磁性微球重悬液,充分振荡,使磁性微球悬浮;将96孔反应板在多功能流式分析仪上测试。

[0029] 上述基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法,克服了免疫分析法中认为全血中的凝血因子会对检测结果产生影响、而采用血清作为检测样品进行分析的普遍认识,通过采用滤纸干血斑(全血)结合流式荧光发光法(化学发光免疫分析法中的一种)测定IgG抗体或IgM抗体,解决了现有检测方法中需样本量较多的问题,减少了需要的样本量,对人体损伤小,样本便于保存和运输,特别是针对采用对象是新生儿时,无需静脉采血,采样更加方便。

附图说明

[0030] 为了更清楚地说明本申请实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0031] 图1为本发明方法与基于静脉血清检测ToRCH IgG抗体相关性示意图;

[0032] 图2为本发明方法与基于静脉血清检测ToRCH IgM抗体相关性示意图。

具体实施方式

[0033] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过实施例,并结合附

图,对本发明的基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0034] 本发明基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体,采样量少,采样方便,结合流式荧光发光法能达到基于静脉血清检测ToRCH10项抗体的准确性。具体的,本发明方法包括以下步骤:

[0035] 从滤纸片干血斑打下直径为2-4mm的血片;

[0036] 血片采用样本稀释液复溶,制得复溶样品;

[0037] 复溶样品采用流式荧光发光法测定。

[0038] 样本稀释液优选为包括羊抗人IgG抗体或牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液。

[0039] 血片采用样本稀释液复溶是将4-8片血片置于离心管中,向离心管中加入100-200 μ L样本稀释液,室温震荡0.5-2h复溶,制得复溶样品。

[0040] 流式荧光发光法包括以下步骤:

[0041] 步骤1:将所述复溶样品与磁性微球悬液混合,使复溶样品中的特异性IgG抗体或IgM抗体分别结合到交联有与所述IgG抗体或IgM抗体对应抗原的磁性微球上,洗涤去除反应后的剩余液体,制得磁性微球-抗原-抗体复合物;

[0042] 其中,步骤1具体为:

[0043] 在96孔反应板上各孔加入50 μ L/孔的磁性微球悬液;

[0044] 在96孔反应板上各孔中分别加入10 μ L/孔的对照品,阴性质控品、阳性质控品以及复溶样品;其中对照品优选加入复数个孔位;

[0045] 加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30分钟;

[0046] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔的洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,以除去反应残留物。

[0047] 步骤2:将藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体加入步骤1制备的磁性微球-抗原-抗体复合物中,洗涤去除反应后的剩余液体,制得磁性微球-抗原-抗体-藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体复合物;

[0048] 其中,步骤2具体为:

[0049] 在所述步骤1处理后的96孔反应板的各孔分别加入50 μ L/孔的藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体溶液,加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30min;

[0050] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,以去除反应残留物。

[0051] 步骤3:将磁性微球重悬液加入步骤2制备的磁性微球-抗原-抗体-藻红蛋白标记的抗人IgG抗体或IgM抗体复合物中,采用多功能流式分析仪检测。

[0052] 其中,步骤3具体为:

[0053] 在所述步骤2处理后的96孔反应板的各孔分别加入150 μ L/孔的磁性微球重悬液,充分振荡,使磁性微球悬浮;将96孔反应板在多功能流式分析仪上测试。

[0054] 本发明实施例与参照例采用的仪器与试剂如下:

[0055] 仪器:医用低速离心机(北京白洋医疗器械有限公司),多功能流式分析仪Luminex 200(美国Luminex公司),Harris Micro-punch打孔器(美国Harris公司)。

[0056] 试剂：弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒（上海透景公司），弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒（上海透景公司）。

[0057] 其中，弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中各溶液成分如表1所示；弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中各溶液成分如表2所示。

[0058] 表1弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中各溶液成分表

[0059]

溶液名称	规格	数量	主要成分	保存条件
样本稀释液	20 mL/瓶	1 瓶	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液（PH=7.2），含 5%牛血清白蛋白	2-8℃
磁性微球	5 mL/瓶	1 瓶	分别交联弓形虫抗原、风疹病毒抗	2-8℃

[0060]

悬液			原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒1型抗原以及单纯疱疹病毒2型抗原的不同编码的磁性微球悬液	
藻红蛋白标记的抗人 IgG 抗体溶液	5 mL/瓶	1 瓶	藻红蛋白标记的抗人 IgG 单抗	2-8℃
浓缩洗液	20 mL/瓶	1 瓶	0.25 mol/L 的磷酸盐缓冲液（PH=7.2）	2-8℃
磁性微球重悬液	20 mL/瓶	1 瓶	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液（PH=7.4）	2-8℃
对照品	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃
阴性质控品	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃
阳性质控品	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃

[0061] 其中,浓缩洗液使用前用去离子水10倍稀释后备用。

[0062] 表2弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中各溶液成分表

[0063]

溶液名称	规格	数量	主要成分	保存条件
样本稀释液	20 mL/瓶	1 瓶	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PH=7.2),含羊抗人 IgG 抗体	2-8℃
磁性微球悬液	5 mL/瓶	1 瓶	分别交联弓形虫抗原、风疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒1型抗原以及单纯疱疹病毒2型抗原的不同编码的磁性微球悬液	2-8℃

[0064]

藻红蛋白标记的抗人 IgG 抗体溶液	5 mL/瓶	1 瓶	藻红蛋白标记的抗人 IgM μ 链抗体	2-8℃
浓缩洗液	20 mL/瓶	1 瓶	0.25 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PH=7.2)	2-8℃
磁性微球重悬液	20 mL/瓶	1 瓶	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PH=7.4)	2-8℃
对照品	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃
阴性质控品	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃
阳性质控品 1	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃
阳性质控品 2	30 μ L/管	1 管	人血清	2-8℃

[0065] 其中,浓缩洗液使用前用去离子水10倍稀释后备用。

[0066] 本发明的滤纸片干血斑优选的采样点位脚后跟、脚大拇指、手指尖,优选的针刺后

用滤纸蘸取血滴或将血滴滴在滤纸片上,采样后的滤纸室温放置1-2h进行干燥,制备滤纸片干血斑备用。

[0067] 本发明静脉血清作为参照样品,验证本发明方法的准确性。静脉血清采用如下方法制备:用促凝管采集静脉血,室温放置半小时后8000rpm离心4分钟,取上层血清备用。

[0068] 本发明具体实施例的复溶样品与参照例的参照样品来自6位受试者,实施例的滤纸片干血斑测试样本采样点为手指尖,分别记为S1、S2、S3、S4、S5以及S6,由该滤纸片干血斑制备的复溶样品分别记为复溶样品S1-S6;参照样品的静脉血清采自静脉,分别记为C1、C2、C3、C4、C5以及C6。

[0069] 实施例1

[0070] 取弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中的对照品、阴性质控品、阳性质控品1-2以及静脉血清C1-C6各10 μ L,分别用200 μ L弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中IgG样本稀释液进行稀释,制得对照品稀释液、阴性质控品稀释液、阳性质控品1-2稀释液、静脉血清C1-C6稀释液;

[0071] 用打孔器分别在滤纸片干血斑S1-S6上打4个直径为3毫米的圆片放入离心管中,打孔位置需覆盖满全血,分别加入100 μ L弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中IgG样本稀释液室温震荡1小时进行复溶,制得复溶样品S1-S6。

[0072] 步骤1

[0073] 在96孔反应板上各孔加入50 μ L/孔的弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中的磁性微球悬液;

[0074] 再在96孔反应板上各孔中分别加入对照品稀释液、阴性质控品稀释液、阳性质控品1-2稀释液、静脉血清C1-C6稀释液以及复溶样品S1-S6,10 μ L/孔;

[0075] 加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30分钟;

[0076] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔的洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,重复洗涤3次,以除去反应残留物。

[0077] 步骤2

[0078] 在步骤1处理后的96孔反应板的各孔分别加入50 μ L/孔的弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中的藻红蛋白标记的抗人IgG抗体溶液,加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37 $^{\circ}$ C恒温箱避光反应30min;

[0079] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,重复洗涤3次,以去除反应残留物。

[0080] 步骤3

[0081] 在步骤2处理后的96孔反应板的各孔分别加入150 μ L/孔的弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中的磁性微球重悬液,充分振荡,使磁性微球悬浮;将96孔反应板在多功能流式分析仪上测试。

[0082] 测试结果如表3所示。

[0083] 表3实施例1测试结果

[0084]

样本信息	Tox-IgG	Rub-IgG	CMV-IgG	HSV1-IgG	HSV2-IgG
特定项目 Cutoff Value 参考值 (PCi)	725.25	4091.5	1536	4413	4857
对照品特定 项目平均信 号值 (COVi)	819.53	3191.37	353.28	2603.67	3594.18
阴性质控品	在控	在控	在控	在控	在控
阳性质控品	在控	在控	在控	在控	在控
C1-血清	0.4759	5.3345	11.2574	3.5485	2.2753
S1-干血斑	0.3722	4.8568	11.4484	3.2151	2.0069
C2-血清	0.0567	0.5374	1.4125	5.9359	0.0378
S2-干血斑	0.0683	0.5825	1.6262	5.7354	0.0445
C3-血清	0.1178	0.6972	4.9111	4.4944	0.0275
S3-干血斑	0.1812	0.8388	5.0159	4.6673	0.041
C4-血清	0.4173	2.3282	4.311	1.3523	0.1146
S4-干血斑	0.4344	2.2874	4.8941	1.2002	0.1274
C5-血清	0.0653	0.0089	2.5292	4.7518	0.0245
S5-干血斑	0.0903	0.0121	3.1066	4.5205	0.027
C6-血清	0.1733	2.9494	6.5812	4.2402	0.1366
S6-干血斑	0.2294	3.3395	7.9002	4.3915	0.1516

[0085] 实施例2

[0086] 取弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中的对照品、阴性质控品、阳性质控品以及静脉血清C1-C6各10μL,分别用200μL弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgG抗体检测试剂盒中IgM样本稀释液进行稀释,制得对照品稀释液、阴性质控品稀释液、阳性质控品稀释液、静脉血清C1-C6稀释液;

[0087] 用打孔器分别在滤纸片干血斑S1-S6上打4个直径为3毫米的圆片放入离心管中,打孔位置需覆盖满全血,分别加入100μL弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中ToRCH IgM样本稀释液室温震荡1小时进行复溶,制得复溶样品S1-S6。

[0088] 步骤1

[0089] 在96孔反应板上各孔加入50μL/孔的弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中的磁性微球悬液;

[0090] 再在96孔反应板上各孔中分别加入对照品稀释液、阴性质控品稀释液、阳性质控品稀释液、静脉血清C1-C6稀释液以及复溶样品S1-S6,10μL/孔;

[0091] 加盖封板纸,微孔板振荡器上充分混匀,置37℃恒温箱避光反应30min;

[0092] 取出96孔反应板,振荡30s混匀后置于磁板上静置60s,甩掉反应液后各孔分别加入200μL/孔的洗液,重悬30s后置于磁板上静置60s,甩掉洗液,重复洗涤3次,以除去反应残

留物。

[0093] 步骤2

[0094] 在步骤1处理后的96孔反应板的各孔分别加入50 μ L/孔的弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中的藻红蛋白标记的抗人IgM抗体溶液，加盖封板纸，微孔板振荡器上充分混匀，置37℃恒温箱避光反应30min；

[0095] 取出96孔反应板，振荡30s混匀后置于磁板上静置60s，甩掉反应液后各孔分别加入200 μ L/孔洗液，重悬30s后置于磁板上静置60s，甩掉洗液，重复洗涤3次，以去除反应残留物。

[0096] 步骤3

[0097] 在步骤2处理后的96孔反应板的各孔分别加入150 μ L/孔的弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒1型/2型IgM抗体检测试剂盒中的磁性微球重悬液，充分振荡，使磁性微球悬浮；将96孔反应板在多功能流式分析仪上测试。

[0098] 测试结果如表4所示。

[0099] 表4实施例2测定结果

[0100]

样本信息	Tox-IgM	Rub-IgM	CMV-IgM	HSV1-IgM	HSV2-IgM
特定项目 Cutoff Value 参考值 (PCi)	361.75	290	1652.25	583.5	684
对照品特定 项目平均信 号值 (COVi)	1736.4	1087.5	2313.15	1919.71	1887.84
阴性质控品	在控	在控	在控	在控	在控
阳性质控品 1	在控	在控	/	/	在控
阳性质控品 2	/	/	在控	在控	/
C1-血清	0.4832	0.3416	0.3612	0.1927	0.2431
S1-干血斑	0.3386	0.2611	0.214	0.2537	0.1944
C2-血清	0.1846	0.6644	0.3774	0.8803	0.3719
S2-干血斑	0.1163	0.4221	0.2287	0.8848	0.2826
C3-血清	0.1471	0.1241	0.6742	0.3675	0.1616
S3-干血斑	0.1065	0.1177	0.533	0.3891	0.1367
C4-血清	0.3674	0.8101	0.1083	0.1758	0.6574
S4-干血斑	0.2557	0.7048	0.0938	0.1331	0.5414
C5-血清	0.1397	0.0975	0.0558	0.1604	0.473
S5-干血斑	0.0988	0.086	0.0452	0.1375	0.3917
C6-血清	0.1728	0.1237	0.4794	0.3725	0.4314
S6-干血斑	0.1261	0.0956	0.4937	0.3094	0.4142

[0101] 用透景公司软件对实施例1以及实施例2的测定结果进行定性分析，其中，结果 ≥ 1 为阳性， < 1 为阴性。

[0102] ToRCHIgG 5项检测6位受检者,参照品测试结果分别为Tox-IgG 0/6、Rub-IgG 3/6、CMV-IgG 0/6、HSV1-IgG 6/6、HSV2-IgG 1/6,测定样本测定结果分别为Tox-IgG 0/6、Rub-IgG 3/6、CMV-IgG 0/6、HSV1-IgG 6/6、HSV2-IgG 1/6,血清与DBS指尖全血结果阳性符合率为100%。

[0103] ToRCH IgM5项检测6位受检者,参照品测定结果分别为Tox-IgM 0/6、Rub-IgM 0/6、CMV-IgM 0/6、HSV1-IgM 0/6、HSV2-IgM 0/6,测定样本测定结果分别为Tox-IgM 0/6、Rub-IgM 0/6、CMV-IgM 0/6、HSV1-IgM 0/6、HSV2-IgM 0/6,血清与DBS指尖全血结果阳性符合率为100%。

[0104] 请参阅图1和图2所示,以参照品测定结果为x坐标,测定样本测定结果为纵坐标进行拟合,ToRCH IgG得拟合曲线 $y=1.0278x+0.0111$, $R^2=0.987$,ToRCH IgM得拟合曲线 $y=0.8649x-0.0139$, $R^2=0.9203$,相关性非常好。说明本发明方法与参照品的测定结果与静脉血清测定结果相同,本发明方法可以完全替代静脉血清样品进行ToRCH10项抗体检测,减少了样品需要量。另外,滤纸干血斑样品更易保存和运输,降低了ToRCH10项抗体检测成本。

[0105] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

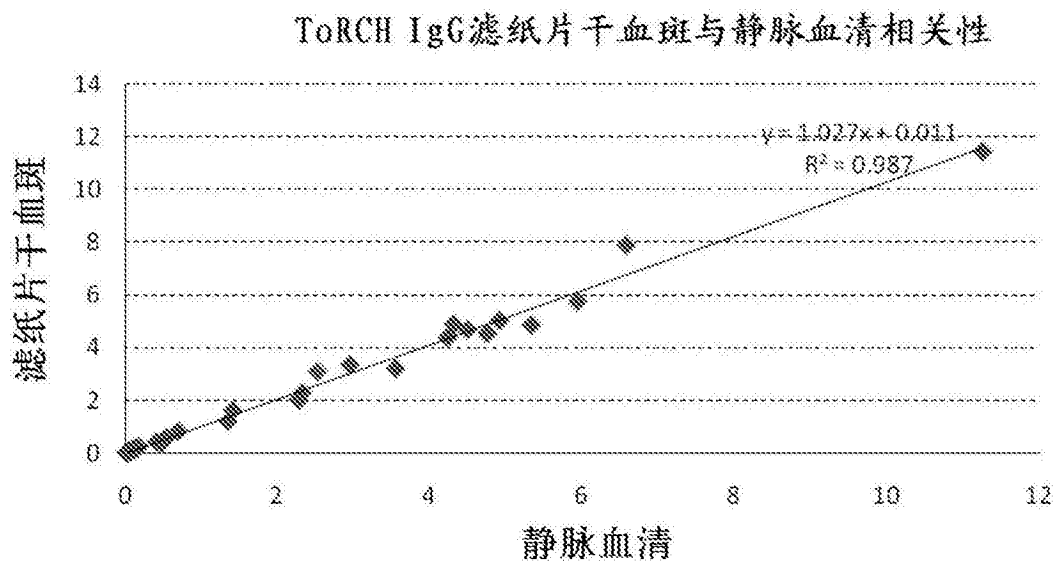


图1

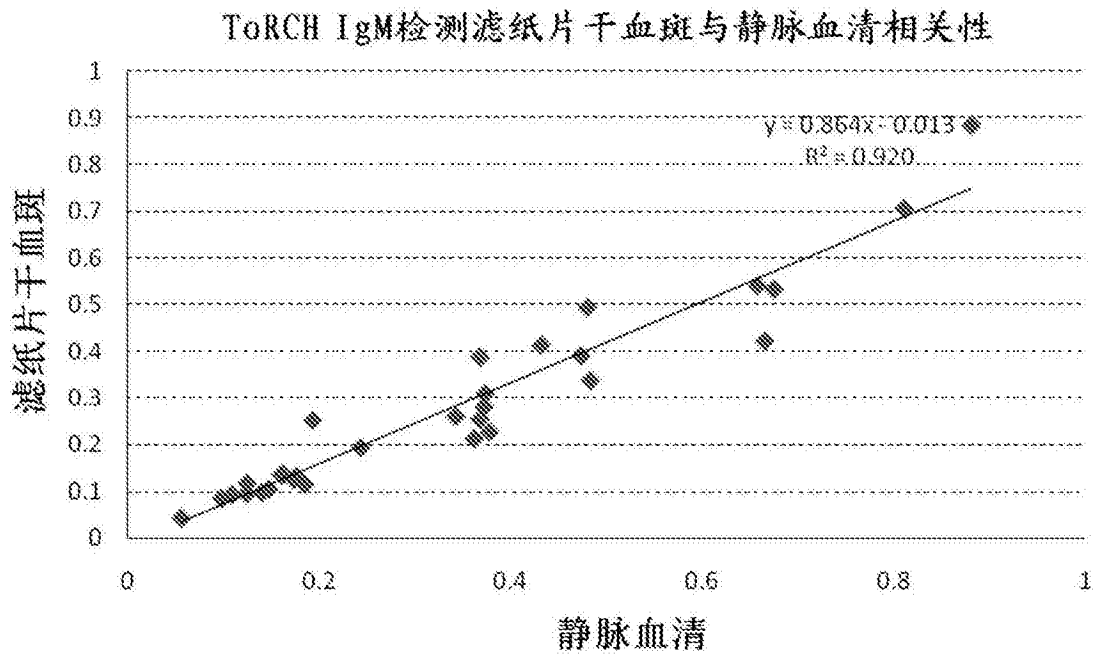


图2

专利名称(译)	基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法		
公开(公告)号	CN106501528A	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	CN201610951274.8	申请日	2016-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	杭州量康科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州量康科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州量康科技有限公司		
[标]发明人	陈姗姗 骆亦奇 余国良		
发明人	陈姗姗 骆亦奇 余国良		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/56905 G01N33/56983 G01N33/56994 G01N2469/20		
代理人(译)	马敬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法，其中，所述方法包括以下步骤：从滤纸片干血斑取得直径为2-4mm的血片；将血片采用样本稀释液复溶，制得复溶样品；复溶样品采用流式荧光发光法测定。上述基于滤纸干血斑检测ToRCH10项抗体的方法，采用干全血滤纸法结合流式荧光发光法测定IgG抗体或IgM抗体，解决了现有检测方法中需样本量较多的问题，减少了需要的样本量，对人体损伤小，样本便于保存和运输，特别是针对采用对象是新生儿时，无需静脉采血，采样更加方便。

