



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102507958 A

(43) 申请公布日 2012. 06. 20

(21) 申请号 201110362205. 0

(22) 申请日 2011. 11. 16

(71) 申请人 江苏星驰生物科技有限公司

地址 215500 江苏省苏州市常熟市东南开发
区常昆工业园荣升路 12 号

(72) 发明人 张慧东 卜英俊 王彬 陈芳
顾培华

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

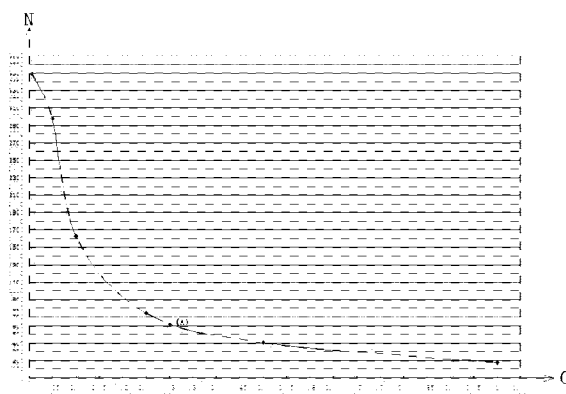
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种 IgG 含量的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 IgG 含量的检测方法,属于医药分析检测领域。它包括样品处理、样品与 SPA 产生免疫复合物以及补体结合检测步骤。本发明所述的 IgG 含量的检测方法检测结果精确,成功弥补了 IgG 检测领域中不同检测方法误差大的缺点,能精确地检测初乳 IgG 的含量,对产品的开发和品质有着至关重要的作用,同样此方法可以应用到其他免疫蛋白的检测中,对其他生物制药行业及保健品行业有着重要的推动作用。



1. 一种 IgG 含量的检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 将标准 IgG 溶于缓冲液中配制成多个浓度的标准溶液,并分别检测每个标准溶液中的红细胞基数后制作标准曲线图;

(2) 将样品 IgG 与过量浓度的 SPA 混合反应,制备 IgG-SPA 复合物;

(3) 将 IgG-SPA 复合物与过量猪血清补体反应,产生的补体结合物与红细胞发生溶血反应,计算红细胞基数,与标准曲线对照即得样品 IgG 含量。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于:所述步骤(1)中标准曲线图的制作方法如下:首先制备 IgG 标准溶液:在缓冲液中溶解 IgG 标准物质分别配制成为 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml 的标准溶液,然后通过 IgG-SPA 结合反应及补体结合反应得到红细胞数量,从而制备标准曲线图。

3. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于:步骤(2)中制备 IgG-SPA 复合物的方法为:首先采用缓冲液配制与步骤(1)中标准溶液对应浓度的样品溶液,放入超声波清洗机中超声 2-20min,精确吸取 20-200 μ l 样品备用;然后采用缓冲液配制 5 倍以上 IgG 样品溶液浓度的 SPA 溶液,放入超声波清洗机中超声 2-20min,精确吸取 20-200 μ l SPA 备用;将备用的 IgG 与备用的 SPA 溶液进行对应混合,反应生成 IgG-SPA 复合物。

4. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于:步骤(3)中将 IgG-SPA 复合物与过量猪血清补体反应,产生的补体结合物与红细胞发生溶血反应的步骤为:首先采用缓冲液配制 5 倍以上 IgG 样品溶液浓度的血清补体溶液,放入超声波清洗机中超声 2-20min,精确吸取 20-200 μ l 血清补体溶液备用;然后将步骤(2)中的 IgG-SPA 复合物与备用的血清补体溶液反应生成补体结合物;再精确吸取 20-200 μ l 补体结合物与标准红细胞发生溶血反应。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的检测方法,其特征在于:所述的缓冲液为 PH=6.0 的 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液。

一种 IgG 含量的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药分析检测领域,特别涉及一种牛初乳中 IgG 含量的检测方法。

背景技术

[0002] 牛初乳是母牛产仔后 72 小时内分泌的乳汁,在以往生产实践中,往往被当成没有作用的东西抛弃,在现今科学研究中证明,初乳中的 IgG 含量非常的高,可到达 59-80mg/ml,有很高的利用价值。

[0003] 目前国内主要的检测 IgG 含量的方法有:单项免疫扩散法、HPLC 法、电泳法,但是精确度并不高,有着较大的误差。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种精确度高、操作简单的 IgG 含量的检测方法。

[0005] 一种 IgG 含量的检测方法,它包括如下步骤:

[0006] 1、将标准 IgG 溶于缓冲液中配制成多个浓度的标准溶液,并分别检测每个标准溶液中的红细胞基数后制作标准曲线图;

[0007] 2、将样品 IgG 与过量浓度的 SPA 混合反应,制备 IgG-SPA 复合物;

[0008] 3、将 IgG-SPA 复合物与过量猪血清补体反应,产生的补体结合物与红细胞发生溶血反应,计算红细胞基数,与标准曲线对照即得样品 IgG 含量。

[0009] 其中,优选地,所述步骤 1 中标准曲线图的制作方法如下:首先制备 IgG 标准溶液:在缓冲液中溶解 IgG 标准物质分别配制成为 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml 的标准溶液,然后通过 IgG-SPA 结合反应及补体结合反应得到红细胞数量,从而制备标准曲线图。

[0010] 其中,优选地,步骤 2 中制备 IgG-SPA 复合物的方法为:首先采用缓冲液配制与步骤 1 中标准溶液对应浓度的样品溶液,放入超声波清洗机中超声 2-20min,精确吸取 20-200ul 样品备用;然后采用缓冲液配制 5 倍以上 IgG 样品溶液浓度的 SPA 溶液,放入超声波清洗机中超声 2-20min,精确吸取 20-200ul SPA 备用;将备用的 IgG 与备用的 SPA 溶液进行对应混合,反应生成 IgG-SPA 复合物。

[0011] 其中,优选地,步骤 3 中将 IgG-SPA 复合物与过量猪血清补体反应,产生的补体结合物与红细胞发生溶血反应的步骤为:首先采用缓冲液配制 5 倍以上 IgG 样品溶液浓度的血清补体溶液,放入超声波清洗机中超声 2-20min,精确吸取 20-200ul 血清补体溶液备用;然后将步骤 2 中的 IgG-SPA 复合物与备用的血清补体溶液反应生成补体结合物;再精确吸取 20-200ul 补体结合物与标准红细胞发生溶血反应。

[0012] 其中,优选地,所述的缓冲液为 PH6.0 的 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer, PB)。

[0013] 有益效果:本发明通过 IgG 分子的 Fc 段与 SPA (Staphylococcal protein A) 葡萄球菌 A 蛋白发生结合,产生的复合物可与标准猪血清中的补体发生补体结合反应,使特定

浓度的红细胞标准液发生溶血反应,通过红细胞计数对比来检测 IgG 含量,该检测方法检测结果精确,成功弥补了 IgG 检测领域中不同检测方法误差大的缺点,能精确的检测初乳 IgG 的含量,对产品的开发和品质有着至关重要的作用,同样此方法可以应用到其他免疫蛋白的检测中,对其他生物制药行业及保健品行业有着重要的推动作用。

附图说明

[0014] 图 1 为实施例 1 的标准曲线图,其以标准液浓度 C(mg/ml) 为横坐标,以红细胞基数 N(个) 为纵坐标,

[0015] 其中, A 点为实施例 1 中红细胞基数与对应浓度的坐标点;

[0016] 图 2 为实施例 2 的标准曲线图,其以标准液浓度 C(mg/ml) 为横坐标,以红细胞基数 N(个) 为纵坐标,

[0017] 其中, B 点为实施例 2 中红细胞基数与对应浓度的坐标点;

[0018] 图 3 为实施例 3 的标准曲线图,其以标准液浓度 C(mg/ml) 为横坐标,以红细胞基数 N(个) 为纵坐标,

[0019] 其中, C 点为实施例 3 中红细胞基数与对应浓度的坐标点。

具体实施方式

[0020] 下述实施例中缓冲液的配制方法:0.2mol/L 的磷酸氢二钠和 0.2mol/L 磷酸二氢钠,按照 7 : 1 的体积比混合成 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液,PH 值调至 6.0。

[0021] 标准 IgG 采用 Sigma 公司提供的纯度 $\geq 95\%$ 的 IgG 标准品。

[0022] IgG 标准溶液采用标准 IgG 与磷酸盐缓冲液按照浓度 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml 分别配置。

[0023] 实施例 1

[0024] 一种 IgG 含量的检测方法,其包括如下步骤:

[0025] 标准曲线的制定:将标准 IgG 溶于缓冲液中配制 IgG 标准溶液,浓度分别为 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml,采用 IgG-SPA 补体结合法测定,红细胞基数分别为 177、403、742、1632、2980。最低检出含量为 0.005mg。

[0026] 将样品 IgG 用缓冲液精确配制成 1mg/ml 的 IgG 样品溶液,精确吸取 100u1 置于样品管中,放入超声波清洗器中混合 15min。配制 5 倍 IgG 样品溶液浓度的 SPA 溶液,在样品管中与 IgG 样品溶液充分混合,进行 IgG-SPA 复合反应,为了加快反应,可以放入超声波清洗器中混合 10min 生成 IgG-SPA 复合溶液。同时配制 5 倍 IgG 样品溶液浓度的猪血清补体液,与上述 IgG-SPA 复合溶液混合,进行补体结合反应,为了加快反应,可以放入超声波清洗器中混合 8min,精确吸取 100u1 补体结合反应后溶液与标准红细胞检测液发生溶血反应,并进行红细胞基数为 611,对照图 1 中的标准曲线图,基数 611 对应的标准品浓度为 0.3mg/ml,即 1mg/ml 的 IgG 样品溶液与 0.3mg/ml 的 IgG 标准溶液中 IgG 含量相同,即 $0.3\text{mg/ml} \times 0.95 = 0.285\text{mg/ml}$, $0.285/1 \times 100\% = 28.50\%$,即待测样品液中 IgG 含量为 28.5%。

[0027] 实施例 2

[0028] 一种 IgG 含量的检测方法,其包括如下步骤:

[0029] 标准曲线的制定:将标准 IgG 溶于缓冲液中配制 IgG 标准溶液,浓度分别为 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml,采用 IgG-SPA 补体结合法测定,红细胞基数分别为 204、398、750、1666、3202。最低检出含量为 0.008mg。

[0030] 将样品 IgG 用缓冲液精确配制成 0.5mg/ml 的 IgG 样品溶液,精确吸取 200ul 置于样品管中,放入超声波清洗器中混合 5min。配制 7 倍 IgG 样品溶液浓度的 SPA 溶液,在样品管中与 IgG 样品溶液充分混合,进行 IgG-SPA 复合反应,为了加快反应,可以放入超声波清洗器中混合 20min 生成 IgG-SPA 复合溶液。同时配制 7 倍 IgG 样品溶液浓度的猪血清补体液,与上述 IgG-SPA 复合溶液混合,进行补体结合反应,为了加快反应,可以放入超声波清洗器中混合 10min,精确吸取 100ul 补体结合反应后溶液与标准红细胞检测液发生溶血反应,并对红细胞基数为 1140,对照图 2 中的标准曲线图,基数 1140 对应的标准品浓度为 0.152mg/ml,即 0.5mg/ml 的 IgG 样品溶液与 0.152mg/ml 的 IgG 标准溶液中 IgG 含量相同,即 $0.152\text{mg/ml} \times 0.95 = 0.1444\text{mg/ml}$, $0.1444/0.5 \times 100\% = 28.88\%$,即待测样品液中 IgG 含量为 28.88%。

[0031] 实施例 3

[0032] 一种 IgG 含量的检测方法,其包括如下步骤:

[0033] 标准曲线的制定:将标准 IgG 溶于缓冲液中配制 IgG 标准溶液,浓度分别为 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml,采用 IgG-SPA 补体结合法测定,红细胞基数分别为 1377、756、1647、3120。最低检出含量为 0.007mg。

[0034] 将样品 IgG 用缓冲液精确配制成 0.25mg/ml 的 IgG 样品溶液,精确吸取 20ul 置于样品管中,放入超声波清洗器中混合 10min。配制 10 倍 IgG 样品溶液浓度的 SPA 溶液,在样品管中与 IgG 样品溶液充分混合,进行 IgG-SPA 复合反应,为了加快反应,可以放入超声波清洗器中混合 5min 生成 IgG-SPA 复合溶液。同时配制 10 倍 IgG 样品溶液浓度的猪血清补体液,与上述 IgG-SPA 复合溶液混合,进行补体结合反应,为了加快反应,可以放入超声波清洗器中混合 2min,精确吸取 20ul 补体结合反应后溶液与标准红细胞检测液发生溶血反应,并对红细胞基数为 1855,对照图 3 中的标准曲线图,基数 1855 对应的标准品浓度为 0.076mg/ml,即 0.25mg/ml 的 IgG 样品溶液与 0.076mg/ml 的 IgG 标准溶液中 IgG 含量相同,即 $0.076\text{mg/ml} \times 0.95 = 0.0722\text{mg/ml}$, $0.0722/0.25 \times 100\% = 28.88\%$,即待测样品液中 IgG 含量为 28.88%。

[0035] 需要说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制。尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对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范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

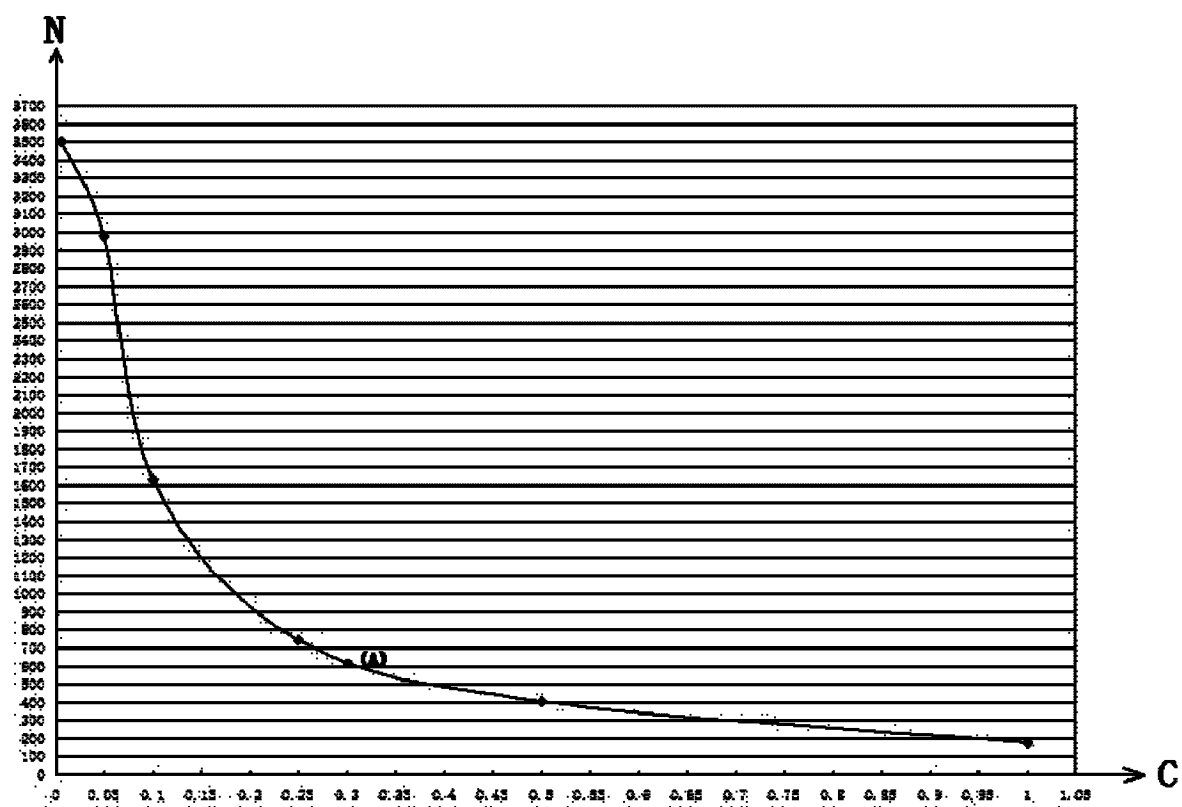


图 1

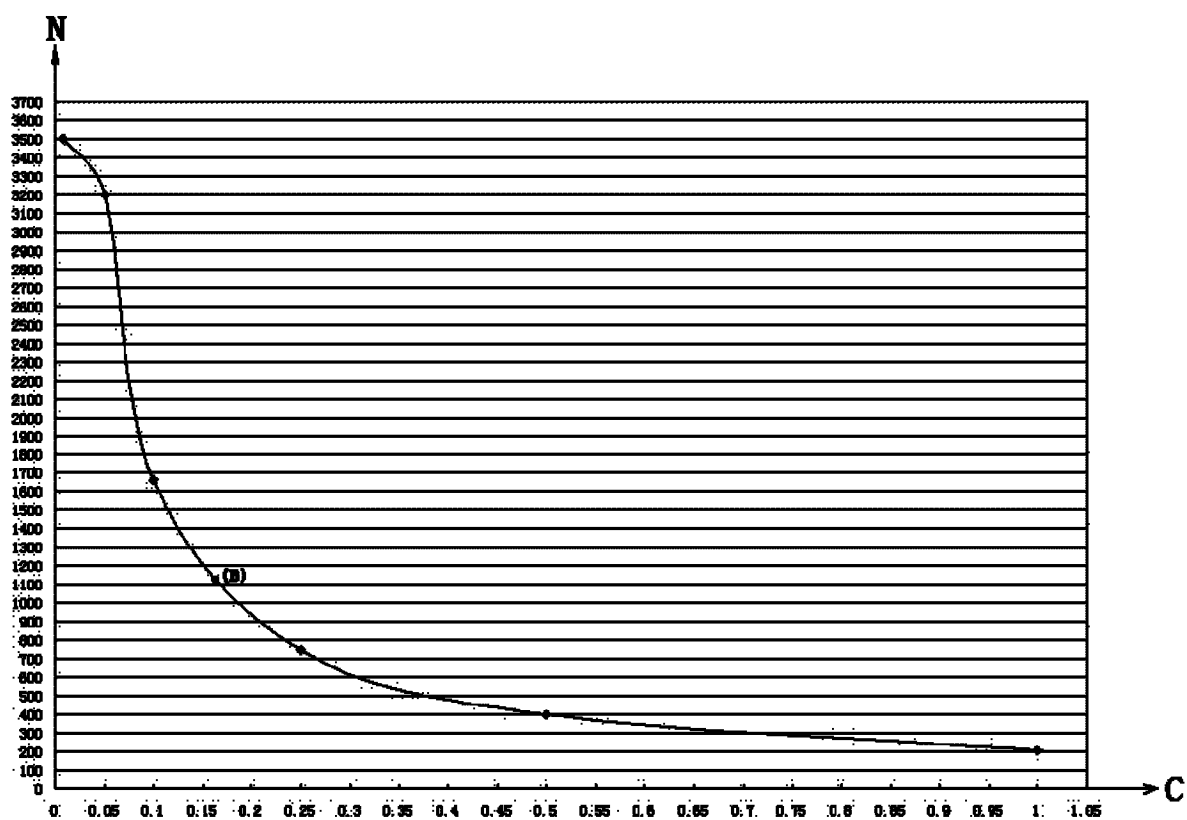


图 2

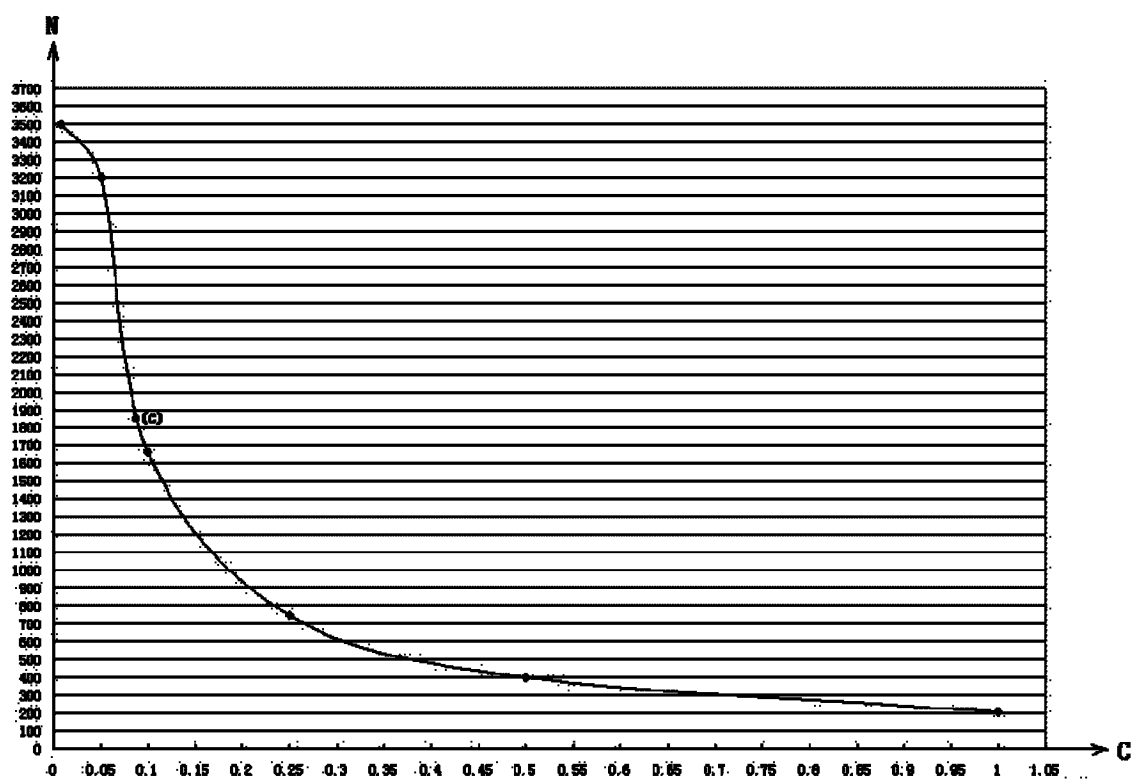


图 3

专利名称(译)	一种IgG含量的检测方法		
公开(公告)号	CN102507958A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110362205.0	申请日	2011-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	江苏星驰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏星驰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏星驰生物科技有限公司		
[标]发明人	张慧东 卜英俊 王彬 陈芳 顾培华		
发明人	张慧东 卜英俊 王彬 陈芳 顾培华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种IgG含量的检测方法，属于医药分析检测领域。它包括样品处理、样品与SPA产生免疫复合物以及补体结合检测步骤。本发明所述的IgG含量的检测方法检测结果精确，成功弥补了IgG检测领域中不同检测方法误差大的缺点，能精确地检测初乳IgG的含量，对产品的开发和品质有着至关重要的作用，同样此方法可以应用到其他免疫蛋白的检测中，对其他生物制药行业及保健品行业有着重要的推动作用。

