



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109696545 A

(43)申请公布日 2019.04.30

(21)申请号 201811579298.0

(22)申请日 2018.12.24

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 佟欢 宋书杰 任永茂 靳增明
付光宇 吴学炜

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

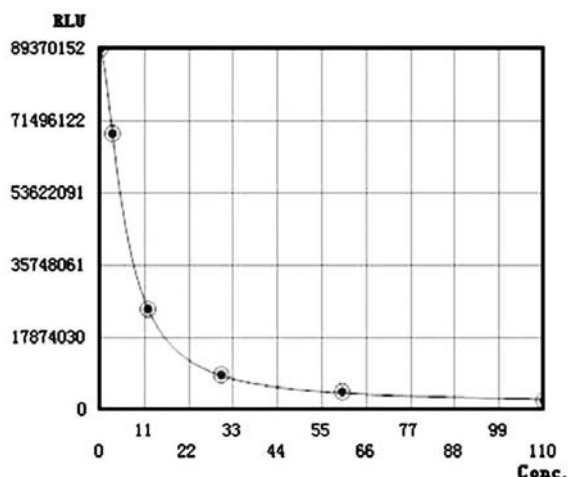
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其免疫测定中是以磁性小球为固定相,在磁性小球包被抗原或抗体后,先使用含有聚氧乙基高分子化合物的试剂对磁性小球进行1~10小时封闭,然后再使用保存液对其进行保存。本发明的优点在于对包被(磁性小球)工艺后处理,降低了检测系统对不同采血管引入干扰物质的敏感性,从而有效改善磁性小球免疫检测中不同采血管之间的基质效应,使同一份标本不同采血管之间测定结果保持较好的一致性。本发明方法可应用在各种免疫检测技术上,包括酶联免疫吸附试验试剂盒、板式化学发光试剂盒等免疫检测技术。



1. 一种用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述免疫测定中以磁性小球为固定相,在磁性小球包被抗原或抗体后,先使用含有聚氧乙基高分子化合物的试剂对磁性小球进行1~10小时封闭,然后再使用保存液对其进行保存。

2. 根据权利要求1所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述试剂中含有聚氧乙基的高分子化合物为聚乙二醇1000、聚乙二醇2000、聚乙二醇5000、聚乙二醇8000、聚乙二醇10000中至少一种或两种及以上组合而成。

3. 根据权利要求2所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述试剂中含有聚氧乙基的高分子化合物的浓度为0.5-20% m/v 。

4. 根据权利要求3所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述试剂中含有聚氧乙基的高分子化合物为聚乙二醇2000,其浓度为5% m/v 。

5. 根据权利要求1所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述含有聚氧乙基高分子化合物的试剂的缓冲液pH值为4.5-9.50。

6. 根据权利要求5所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述含有聚氧乙基高分子化合物的试剂的缓冲液pH值为 6.80 ± 0.5 。

7. 根据权利要求1所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其特征在于:所述试剂对磁性小球进行封闭的时间为4小时。

用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术领域,尤其是涉及一种用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法。

背景技术

[0002] 基质(matrix)尚无统一的解释,曾称为“一种分析物(analyte)的环境”,即指标本中除分析物以外的一切成分及其物理、化学性质(如粘度、离子强度、pH、温度等)。

[0003] 基质效应在临床上按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件的定义是指:①标本中除分析物以外的其它成分对分析物测定值的影响;②基质对分析方法准确测定分析物的能力的干扰。广义来说,基质效应也应包括已知的干扰物(胆红素、血红蛋白、抗坏血酸等干扰物),但目前只将基质效应限于生物材料中未知或未定性的物质或因素(如粘度、pH等)的影响。

[0004] 在基质效应的评估方法方面,通常认为测定新鲜(或冰冻)血清无基质效应,决定性方法或参考方法也无基质效应。但是,临床生化检验中常会用到不同真空采血管,不同采血管(红盖普通管、分离胶管、肝素钠、EDTA-K₂管等)以及不同厂家采血管内添加物往往会对检测结果造成不同程度的影响;当使用不同采血管采集同一份标本时,可能会引起检测系统对同一份标本测定结果有显著差异,甚至误导检验结果的判读。

[0005] 减少基质效应的方法:Naito等(1993年)提出过减少基质效应的研究方向,至今仍有参考价值:改进仪器设计及试剂组成,使其适应性更强,且容易掌握,对基质的确切性质不敏感。但时至今日,暂未有对不同采血管之间存在的基质效应的影响进行研究。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种用于降低磁性小球免疫检测中不同采血管之间基质效应的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法,其免疫测定中是以磁性小球为固定相,在磁性小球包被抗原或抗体后,先使用含有聚氧乙基高分子化合物的试剂对磁性小球进行1~10小时封闭,然后再使用保存液对其进行保存。

[0008] 所述试剂中含有聚氧乙基的高分子化合物为聚乙二醇1000(PEG1000)、聚乙二醇2000(PEG2000)、聚乙二醇5000(PEG5000)、聚乙二醇8000(PEG8000)、聚乙二醇10000(PEG10000)中至少一种或两种及以上组合而成。

[0009] 所述试剂中含有聚氧乙基的高分子化合物的浓度为0.5~20m/v。

[0010] 所述试剂中含有聚氧乙基的高分子化合物为聚乙二醇2000(PEG2000),其浓度为5m/v。

[0011] 所述含有聚氧乙基高分子化合物的试剂的缓冲液pH值为4.5~9.50,优选pH值为6.80±0.5。

[0012] 所述试剂对磁性小球进行封闭的时间为4小时。

[0013] 本发明的优点在于对包被(磁性小球)工艺后处理,降低了检测系统对不同采血管引入干扰物质的敏感性,从而有效改善磁性小球免疫检测中不同采血管之间的基质效应,使同一份标本 不同采血管之间测定结果保持较好的一致性。

[0014] 本发明方法可应用在各种免疫检测技术上,包括酶联免疫吸附试验试剂盒、板式化学发光试剂盒等免疫检测技术。

附图说明

[0015] 图1是是将本发明制备的磁性微球应用于游离甲状腺素检测校准品反应曲线。

[0016] 图2为本发明制备的磁性微球应用于游离甲状腺素检测血清与某进口厂家试剂盒检测结果对比。

具体实施方式

[0017] 下面通过制备游离甲状腺素检测试剂盒来对本发明做更加详细的说明,以利于本领域技术人员的理解。

[0018] 实施例1 制备检测游离甲状腺素相关试剂

1、制备包被有甲状腺原氨酸抗体的磁微粒混悬液

根据使用量取适量的羧基磁微粒,用pH为7.0的0.05M的PBS缓冲液的洗涤4次;然后用过量的EDC 和NHS 在酸性条件下(pH4.5-pH5.5)进行活化,活化缓冲液为0.05M-0.1M的MES (2-(N- 吗啉代) 乙磺酸) 缓冲液,活化时间为60min;活化完成后,加磁场,静置5min使磁微粒与液体分开,弃去上清,用pH 为7.0的0.05M的PBS缓冲液洗涤两遍以洗去多余的活化剂;加入适量的甲状腺素抗体,使其浓度为0.1 μ g/mg磁微粒,在0.05M-0.1M的MES 缓冲液中(pH4.5-pH5.5)震荡反应1h;反应结束后加磁场,静置5min使磁微粒与液体分开,弃去上清,用含有5%(m/v)的聚乙二醇2000 (PEG2000)的PBS缓冲液(pH6.8)进行封闭4h;最后再用含3%牛血清白蛋白的PBS缓冲液(pH6.8)进行封闭保存,使磁微粒的最终浓度为0.5mg/ml,该磁微粒混悬液置于2-8℃保存,以备使用。

[0019] 2、制备游离甲状腺素系列校准品

用含有1%-3% BSA 和0.1-0.3% PC300 的Tris-NaCl缓冲液将甲状腺素纯品配制成为浓度为0pmol/l、5 pmol/l、10 pmol/l、25 pmol/l、50pmol/l、100 pmol/l 的一系列校准品,瓶盖颜色依次为白、黄、绿、蓝、紫、黑。

[0020] 3、制备辣根过氧化物酶标记的甲状腺素

将甲状腺素上的羧基与辣根过氧化物酶(HRP)分子的氨基经EDC的作用缩合为酰胺化合物,透析后即得酶标甲状腺素;在标记好的溶液中,等比加入甘油-20℃保存备用;将标记好的酶标甲状腺素按照1:20000-1:50000 的比例加入到含有20%-50% 小牛血清和PC300 (0.15%-0.25%)的pH 7.4 Tris-NaCl缓冲液中,混合均匀,即为游离甲状腺素检测试剂盒的酶结合物。

[0021] 4、配制发光底物A 液、发光底物B 液及浓缩洗液

发光底物A 液由0.2M Tris-Hcl、0.15mM Luminol、0.59mM 羟基香豆素、0.35mM 没食子酸配制而成;发光底物B 液由0.85mM 氨基酸氧化酶、0.8% Tween 20、0.5mM DTPA、

0.12mM 维生素C 配制而成;浓缩洗液由 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.06g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 62.32g, Tween 20 2-10ml, 蒸馏水 1000ml 配制而成。

[0022] 实施例2 采用实施例1制备的试剂对不同采血管采集的同一份标本进行检测
检测步骤包括:

1、取出一定量的反应容器,编号,根据实验要求加入50 μl 校准品/质控品,不同采血管标本;

2、摇匀磁微粒混悬液,每孔分别加入20 μl ;

3、每孔分别加入酶标记物50 μl ;

4、将反应容器内溶液混合均匀,37℃温育15 分钟;

5、使用磁分离及洗涤设备,将反应容器中磁微粒用洗液洗涤5 次;

6、将洗涤后的反应容器充分振荡使磁微粒散开;

7、每孔加入发光底物A 和发光底物B 各50 μl ,振荡混匀后避光室温反应5 分钟;

8、化学发光检测仪检测发光强度;

9、采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X 轴,以校准品发光强度对数值为Y轴,建立定标曲线。根据待测样本的发光强度值回算相应的浓度值。

[0023] 同样采用上述方法,进行了校准品检测,标准曲线线性R大于0.999(如图1所示)。

[0024] 采用现有游离甲状腺素检测试剂盒(未对微球进行封闭后处理)和某进口厂家的游离甲状腺素检测试剂盒进行检测对比。检测数据如下表1、表2所示。

[0025] 表1

新微球包被工艺制备游离甲状腺素检测试剂盒												
编号	某进口厂家检测值	普通管	A厂家分离胶管	B厂家分离胶管	促凝管	肝素钠管	EDTA-K ₂ 管	枸橼酸钠管	不同采血管测定值平均值	不同采血管测定值标准差	不同采血管测定值变异	不同采血管测定值平均值/某进口厂家检测值
①	15.82	16.11	16.05	15.86	16.14	16.25	15.84	16.36	16.09	0.19	1.19%	1.02
②	17.62	17.32	17.56	17.76	18.08	18.15	17.64	18.21	17.82	0.34	1.89%	1.01
③	16.25	16.34	16.82	16.59	17.02	16.54	16.54	16.31	16.59	0.25	1.52%	1.02
④	18.31	18.2	17.96	17.84	18.26	18.46	17.98	18.13	18.12	0.21	1.16%	0.99
⑤	14.69	14.68	15.06	14.79	15.34	14.58	15.41	15.09	14.99	0.32	2.14%	1.02

表2

原游离甲状腺素检测试剂盒												
编号	某进口厂家检测值	普通管	A厂家分离胶管	B厂家分离胶管	促凝管	肝素钠管	EDTA-K ₂ 管	枸橼酸钠管	不同采血管测定值平均值	不同采血管测定值标准差	不同采血管测定值变异	
①	15.82	16.03	18.06	15.96	14.76	15.44	16.85	16.71	16.26	1.07	6.57%	
②	17.62	17.86	19.21	17.24	16.86	19.85	16.33	18.52	17.98	1.28	7.12%	
③	16.25	17.95	18.14	16.85	16.2	17.88	17.27	15.84	17.16	0.90	5.25%	
④	18.31	17.28	20.35	17.43	16.11	21.35	18.24	18.96	18.53	1.70	8.06%	
⑤	14.69	16.13	16.86	15.49	13.25	15.87	14.6	16.24	15.49	1.21	7.82%	

表1结果显示,采用本发明方法对微球包被后处理的试剂盒对同一人不同采血管标本检测结果具有较高的一致性,不同采血管测定值变异在3%以内,而且与某进口厂家游离甲状腺素试剂盒检测结果偏差在5%以内。

[0026] 表2结果显示,使用原游离甲状腺素检测试剂盒测定,不同采血管之间测定值差异较大,变异系数CV均在5%-10%之间。

[0027] 实施例3 试剂盒对比试验

取80份临床血清样本,采用本发明实施例1的试剂制备工艺制备的游离甲状腺素试剂盒检测,同时采用某进口厂家的游离甲状腺素检测试剂盒进行检测。结果显示,采用的用于免疫测定中不同采血管之间基质效应的工艺的试剂盒检测结果(y)与进口厂家罗氏游离甲状腺素检测试剂盒检测结果(x)的线性回归方程为 $y = 1.0056x - 0.7651$,相关系数可达到 $R^2 = 0.9927$ (如图2所示)。

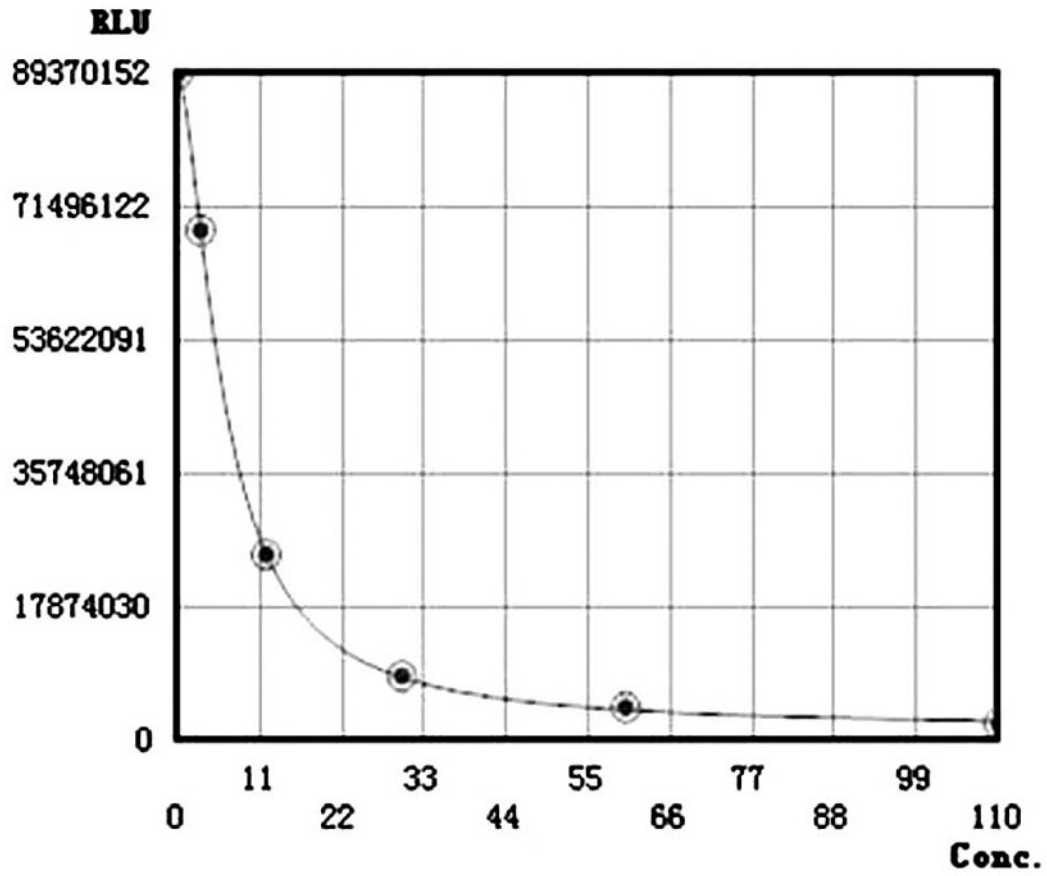


图1

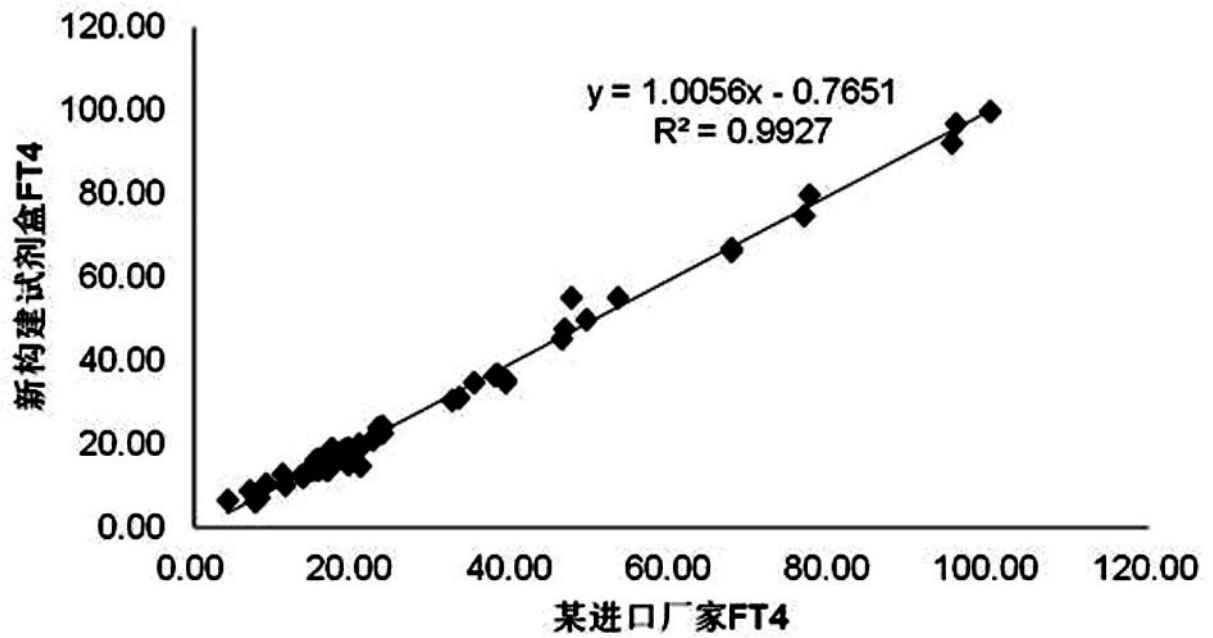


图2

专利名称(译)	用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法		
公开(公告)号	CN109696545A	公开(公告)日	2019-04-30
申请号	CN201811579298.0	申请日	2018-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	佟欢 宋书杰 任永茂 靳增明 付光宇 吴学炜		
发明人	佟欢 宋书杰 任永茂 靳增明 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/54366		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于降低免疫测定中不同采血管之间基质效应的方法，其免疫测定中是以磁性小球为固定相，在磁性小球包被抗原或抗体后，先使用含有聚氧乙基高分子化合物的试剂对磁性小球进行1~10小时封闭，然后再使用保存液对其进行保存。本发明的优点在于对包被（磁性小球）工艺后处理，降低了检测系统对不同采血管引入干扰物质的敏感性，从而有效改善磁性小球免疫检测中不同采血管之间的基质效应，使同一份标本不同采血管之间测定结果保持较好的一致性。本发明方法可应用在各种免疫检测技术上，包括酶联免疫吸附试验试剂盒、板式化学发光试剂盒等免疫检测技术。

