



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541201 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811612512.8

(22)申请日 2018.12.27

(71)申请人 海格德生物科技(深圳)有限公司

地址 518000 广东省深圳市坪山新区大工业区青松路56号友利通科技工业厂区A栋801

(72)发明人 卢岳军 陈雪 仇家舟 钟运华
陈晶晶

(74)专利代理机构 广东恩典律师事务所 44549
代理人 张绍波

(51)Int.Cl.

G01N 33/537(2006.01)

G01N 21/82(2006.01)

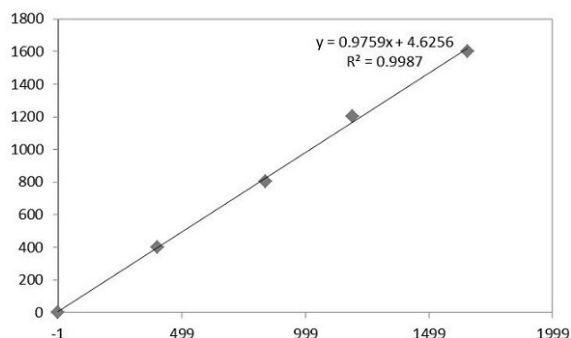
权利要求书1页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

一种提升免疫比浊法准确性的方法

(57)摘要

本发明公开一种提升免疫比浊法准确性的方法。本方法采用磁珠来偶联抗体,通过磁场来快速分离,缩短偶联时间,避免了因为离心而带来的凝聚现象,提高了偶联效率;本方法采用一种或多种粒径的磁珠来进行偶联,优选的采用多粒径的磁珠进行偶联,因为多粒径相对比单粒径偶联,检测的灵敏性和特异性更高;免疫比浊法极易受到溶血、脂肪血的影响而导致结果不准确,本发明中,样本与磁珠-抗体复合物反应后(抗体成功捕获抗原后),应用磁场快速分离,弃掉上清,加入缓冲液重悬复合物,再进行检测,避免了样本的因素而导致的的结果不准确。



1. 一种提升免疫比浊法准确性的方法,其特征在于,包括如下步骤:

分别配置磁珠溶液、EDC溶液、S-NHS溶液;

依次向所述磁珠溶液中加入EDC溶液和S-NHS溶液,混合均匀,置于恒温培养摇床中进行活化;

配置抗体溶液,将活化好的磁珠溶液加入所述抗体溶液中,混合均匀,置于恒温培养摇床中进行偶联反应,得到磁珠-抗体复合物溶液;

向所述磁珠-抗体复合物溶液中加入封闭液,混合均匀,置于恒温培养摇床中进行封闭反应;

将封闭反应后的溶液置于磁板上,弃上清液;

撤掉磁板,加入清洗缓冲液,震荡重悬,弃上清液;

向清洗后的磁珠-抗体复合物溶液中加入磁珠保存液,震荡重悬至溶液中无肉眼可见磁珠颗粒。

2. 根据权利要求1所述的提升免疫比浊法准确性的方法,其特征在于,所述磁珠溶液中包括一种或多种粒径的磁珠。

3. 根据权利要求2所述的提升免疫比浊法准确性的方法,其特征在于,所述磁珠溶液中包括粒径为50-100 nm和粒径为150-300 nm的两种粒径的磁珠。

4. 根据权利要求3所述的提升免疫比浊法准确性的方法,其特征在于,所述粒径为50-100 nm的磁珠和所述粒径为150-300 nm的磁珠的质量比例为2:3。

5. 根据权利要求1所述的提升免疫比浊法准确性的方法,其特征在于,采用MES缓冲液将磁珠配置成0.5-4g/mL的磁珠溶液,采用MES缓冲液将EDC配置成5-15mg/mL的EDC溶液,采用MES缓冲液将S-NHS配置成45-65mg/mL的S-NHS溶液;所述MES缓冲液包括:2-(N-吗啡啉)乙磺酸8-12g/L。

6. 根据权利要求1所述的免疫比浊检测方法,其特征在于,所述偶联反应的时间为3h。

7. 根据权利要求1所述的免疫比浊检测方法,其特征在于,所述封闭反应的时间为0.5-2h。

8. 根据权利要求1所述的免疫比浊检测方法,其特征在于,所述封闭液包括:牛血清白蛋白50-200g/L、甘氨酸10-50g/L、乙醇胺20-40g/L、防腐剂0.5-2mL/L。

9. 根据权利要求1所述的免疫比浊检测方法,其特征在于,所述清洗缓冲液包括:磷酸氢二钠0.1-0.3g/L、磷酸二氢钠2-4g/L、吐温20 0.5mL/L。

10. 根据权利要求1所述的免疫比浊检测方法,其特征在于,所述磁珠保存液包括:Tris 5-8g/L、Tween 20 0.05-0.2mL/L、牛血清白蛋白5-15g/L、蔗糖1-3g/L、防腐剂0.5-2mL/L。

一种提升免疫比浊法准确性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫诊断技术领域,尤其涉及一种提升免疫比浊法准确性的方法。

背景技术

[0002] 免疫比浊法(Turbidimetric inhibition immuno assay)是抗原抗体结合动态测定方法。其基本原理是:当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂(聚乙二醇等)的作用下,自液相析出,形成微粒,使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可计算出检样中抗原的含量。

[0003] 早期免疫分析通过观察沉淀物形成,凝集及溶血现象发生来分析,如免疫扩散、免疫电泳、血凝试验、补体结合等。上世纪50年代末60年代初,利用抗原抗体复合物形成使浊度改变,再用比浊计来比浊,但因其敏感性差未被接受,70年代初,开始有自动检测系统,但因其用的是激光为光源,固定波长,灵敏度较低,而且时间一般要2-3小时,很难满足临床需要,70年代末,速率比浊计的出现,使抗原抗体结合的反应在几十秒内出结果,可以说是免疫化学测定的革命性的发展。随着标记技术的发展,免疫比浊已广泛应用于临床,在临床检测中占据比较重要的位置。

[0004] 胶乳颗粒增强比浊法(Latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay, LETIA)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方法。LETIA法通过在高分子乳胶微球表面交联单克隆抗体,而当抗原与交联有抗体的微球结合后,能够在短时间内迅速聚集在一起,改变反应溶液的吸光度。而且,反应液吸光度的改变与被测抗原的浓度在一定范围内具有线性关系,可用来反映被测抗原的浓度。此方法相对于其他常用的体液蛋白检测方法有很多优势:LETIA省却了酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 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,并且稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的含量;相对胶体金层析法(俗称“金标”)具有更高的灵敏度,可用于定量检测;相比于放射免疫测定(Radioimmunoassay, RIA),则具有更好的稳定性,以及能够避免放射性污染等优点。LETIA相对传统的免疫比浊方法,解决了对抗体结合的能力不强、临床检测的线性范围窄、实验稳定性差等问题,大大促进了免疫比浊法在临床上的广泛应用。但是即便是这种广泛应用的检测方法仍然存在缺陷:乳胶偶联过程中容易产生乳胶聚集现象,灵敏度不高,结果易受到脂血、溶血的影响,准确性较低。

[0005] 因此,现有技术仍有待于改进和发展。

发明内容

[0006] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种提升免疫比浊法准确性的

方法,旨在解决现有乳胶偶联过程中容易产生乳胶聚集现象,灵敏度不高,结果易受到脂血、溶血的影响,准确性较低等的问题。

[0007] 本发明的技术方案如下:

一种提升免疫比浊法准确性的方法,其中,包括如下步骤:

分别配置磁珠溶液、EDC溶液、S-NHS溶液;

依次向所述磁珠溶液中加入EDC溶液和S-NHS溶液,混合均匀,置于恒温培养摇床中进行活化;

配置抗体溶液,将活化好的磁珠溶液加入所述抗体溶液中,混合均匀,置于恒温培养摇床中进行偶联反应,得到磁珠-抗体复合物溶液;

向所述磁珠-抗体复合物溶液中加入封闭液,混合均匀,置于恒温培养摇床中进行封闭反应;

将封闭反应后的溶液置于磁板上,弃上清液;

撤掉磁板,加入清洗缓冲液,震荡重悬,弃上清液;

向清洗后的磁珠-抗体复合物溶液中加入磁珠保存液,震荡重悬至溶液中无肉眼可见磁珠颗粒。

[0008] 进一步地,所述磁珠溶液中包括一种或多种粒径的磁珠。更进一步地,所述磁珠溶液包括两种粒径的磁珠,具体为粒径为50-100 nm和粒径为150-300 nm的两种磁珠。再进一步地,所述粒径为50-100 nm的磁珠和所述粒径为150-300 nm的磁珠的质量比例为2:3。

[0009] 进一步地,采用MES缓冲液将磁珠配置成0.5-4g/mL的磁珠溶液,采用MES缓冲液将EDC配置成5-15mg/mL的EDC溶液,采用MES缓冲液将S-NHS配置成45-65mg/mL的S-NHS溶液。其中,所述MES缓冲液包括:2-(N-吗啡啉)乙磺酸8-12g/L。

[0010] 进一步地,所述活化的时间为15-40min。

[0011] 进一步地,所述偶联反应的时间为3h。

[0012] 进一步地,所述封闭反应的时间为0.5-2h。

[0013] 进一步地,所述封闭液包括:牛血清白蛋白50-200g/L、甘氨酸10-50g/L、乙醇胺20-40g/L、防腐剂0.5-2ml/L。

[0014] 进一步地,所述清洗缓冲液包括:磷酸氢二钠0.1-0.3g/L、磷酸二氢钠2-4g/L、吐温20 0.5mL/L。

[0015] 进一步地,所述磁珠保存液包括:Tris 5-8g/L、Tween 20 0.05-0.2mL/L、牛血清白蛋白5-15g/L、蔗糖1-3g/L、防腐剂0.5-2mL/L。

[0016] 有益效果:本发明通过上述方法,解决了临床上灵敏度不高,结果易受到脂血、溶血的影响,准确性较低的问题,大大增强了检测的准确性,以极低的成本实现了比浊方法灵敏度及精密度的提升。

附图说明

[0017] 图1为采用本发明实施例检测方法获得的线性检测结果的拟合曲线图。

[0018] 图2为采用传统免疫比浊检测方法获得的线性检测结果的拟合曲线图。

[0019] 图3为本发明实施例中Lp-PLA2的标准曲线。

具体实施方式

[0020] 本发明提供一种提升免疫比浊法准确性的方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0021] 本发明提供一种提升免疫比浊法准确性的方法,具体步骤如下:

采用粒径为50-100 nm和150-300 nm的双磁珠来偶联,两种磁珠质量比例为2:3。

[0022] 1溶液配方一览表

1.1 第一检测液

原材料名称	配制1000mL用量
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.1-0.3g
磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2-4g
聚乙二醇	1-5mL

1.2 第二检测液

原材料名称	配制1000mL用量
磁珠保存液	1000 mL
偶联后的磁珠	0.5-4%磁珠-抗体复合物

1.3 MES缓冲液

原材料名称	配制1000mL用量
2-(N-吗啡啉)乙磺酸	8-12g

1.4清洗缓冲液

原材料名称	配制1000mL用量
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.1-0.3g
磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2-4g
吐温20 (Tween 20)	0.5mL

1.5 封闭液

原材料名称	配制100mL用量
牛血清白蛋白 (BSA)	5-20g
甘氨酸 (Gly)	1-5g
乙醇胺	2-4g
防腐剂 (Proclin 300)	0.05-0.2mL

1.6磁珠保存液

原材料名称	配制1000mL用量
Tris	5-8g
Tween 20	0.05-0.2mL
BSA	5-15g
蔗糖	1-3g
防腐剂 (Proclin 300)	0.5-2mL

2实验步骤

2.1磁珠稀释

用MES缓冲液将磁珠稀释至0.5-4g/mL的磁珠溶液。

[0023] 2.2活化

2.2.1活化剂配制:

准确称取EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐),并用MES缓冲液配制成5-15mg/mL的EDC溶液;准确称取S-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺),并用MES缓冲液配制成45-65mg/mL的S-NHS溶液。

[0024] 2.2.2活化

依次向0.5-4g/mL磁珠溶液中加入S-NHS溶液和EDC溶液,快速混匀(充分混匀,但应避免产生气泡),置于恒温培养摇床中活化15-40min(150 rpm,温度25°C)。

[0025] 2.3偶联

2.3.1抗体溶液配制

准确量取和磁珠溶液等体积的MES缓冲液,向其中加入抗体,混匀。

[0026] 2.3.2抗体偶联

将活化好的磁珠溶液加入到抗体溶液中,快速混匀(充分混匀,但应避免产生气泡),置于恒温培养摇床中反应3h(150 rpm,温度25°C)。

[0027] 2.4封闭

向偶联完的磁珠-抗体复合物溶液中加入封闭液,快速混匀(充分混匀,但应避免产生气泡),置于恒温培养摇床中反应0.5-2h(150 rpm,温度25°C)。

[0028] 2.5清洗

2.5.1吸附弃上清

将封闭后的磁珠至于磁板上,30S后弃上清液。

[0029] 2.5.2复洗

撤掉磁板,加入清洗缓冲液,震荡重悬,30S后弃上清液,重复一次。

[0030] 2.6重悬

向清洗后的沉淀物(磁珠-抗体复合物)中加入磁珠保存液,震荡重悬至溶液中无肉眼可见磁珠颗粒。

[0031] 3检验方法

a、试剂准备

R1(第一检测液):上机即用;R2(第二检测液):上机即用。

[0032] b、操作步骤

反应类型:两点终点法,温度:37°C,比色杯光径:1cm;

主波长:500-700nm 单位:ng/l;

取2个反应管,其中一个作为空白管,另外一个作为样本管;

I 分别加入R1180ul,再加入10 ul样本(空白管加纯水),温育2min;

II 分别加入R2 60ul,反应5min;

III 在反应试管底部加入磁板,使磁珠-抗体-抗原复合物吸附在管底部,去掉上清;

IV 分别加入R1 200 ul,重悬磁珠-抗体-抗原复合物;

V 37°C孵育30s,读取空白管吸光度A1,样本管吸光度A2,计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

[0033] c、校准程序

采用多点校准模式,用纯化水为零点,依次对校准品进行定标测定,建立工作曲线。

[0034] d、校准和质控

具有相同方法学的所有校准品和质控品均可使用。

[0035] e、计算方法

以校准品浓度对相应 ΔA 拟合校准曲线,样本浓度值通过校准曲线得出。

[0036] 与传统免疫比浊试剂相比,本发明提出的新的免疫比浊测量方法具有以下优点:

1、传统的乳胶免疫增强比浊试剂中,乳胶微粒偶联或清洗过程中需要高速离心来分离,在离心的过程中,乳胶极易聚集,并且不易分散,用目前常用的分散方法(超声等),也会影响乳胶的偶联效率,导致结果的灵敏度下降,本方法采用磁珠来偶联抗体,通过磁场来快速分离,缩短偶联时间,避免了因为离心而带来的凝聚现象,提高了偶联效率;

2、本方法采用一种或多种粒径的磁珠来进行偶联,优选的采用多粒径的磁珠进行偶联,因为多粒径相对比单粒径偶联,检测的灵敏性和特异性更高;

3、免疫比浊法极易受到溶血、脂肪血的影响而导致结果不准确,本发明中,样本与磁珠-抗体复合物反应后(抗体成功捕获抗原后),应用磁场快速分离,弃掉上清,加入缓冲液重悬复合物,再进行检测,避免了样本的因素而导致的结果不准确。

[0037] 下面通过实施例对本发明进一步说明。

[0038] 本发明实施例的检测方法如下:

1磁珠稀释

用MES缓冲液将磁珠稀释至1g/mL的磁珠溶液。

[0039] 2活化

2.1活化剂配制:

准确称取EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐),并用MES缓冲液配制成10mg/mL的EDC溶液;准确称取S-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺),并用MES缓冲液配制成50mg/mL的S-NHS溶液。

[0040] 2.2活化

依次向1g/mL的磁珠溶液中加入S-NHS溶液和EDC溶液,快速混匀(充分混匀,但应避免产生气泡),置于恒温培养摇床中活化20min(150 rpm,温度25°C)。

[0041] 3偶联

3.1抗体溶液配制

准确量取和磁珠溶液等体积的MES缓冲液,向其中加入(Lp-PLA2)抗体,混匀。

[0042] 3.2抗体偶联

将活化好的磁珠溶液加入到抗体溶液中,快速混匀(充分混匀,但应避免产生气泡),置于恒温培养摇床中反应3h(150 rpm,温度25°C)。

[0043] 4封闭

向偶联完的磁珠-抗体复合物溶液中加入封闭液,快速混匀(充分混匀,但应避免产生气泡),置于恒温培养摇床中反应1h(150 rpm,温度25°C)。

[0044] 5清洗

5.1吸附弃上清

将封闭后的磁珠至于磁板上,30S后弃上清液。

[0045] 5.2复洗

撤掉磁板,加入清洗缓冲液,震荡重悬,30S后弃上清液,重复一次。

[0046] 6重悬

向清洗后的沉淀物(磁珠-抗体复合物)中加入磁珠保存液,震荡重悬至溶液中无肉眼可见磁珠颗粒。

[0047] 7检验方法

a、试剂准备

R1(第一检测液):上机即用;R2(第二检测液):上机即用。

[0048] b、操作步骤

反应类型:两点终点法,温度:37℃,比色杯光径:1cm;

主波长:500-700nm 单位:ng/l;

取6个反应管,1个空白管,5个样本管

I 分别加入R1180ul,再加入10 ul样本(空白管加纯水,样本管分别加入样本1-5),温育2min;

II 分别加入R2 60ul,反应5min;

III 在反应试管底部加入磁板,使磁珠-抗体-抗原复合物吸附在管底部,去掉上清;

IV 分别加入R1 200 ul,重悬磁珠-抗体-抗原复合物;

V 37℃孵育30s,读取空白管吸光度A1,样本管吸光度A2,计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

[0049] c、校准程序

采用多点校准模式,用纯化水为零点,依次对校准品进行定标测定,建立工作曲线。

[0050] d、校准和质控

具有相同方法学的所有校准品和质控品均可使用。

[0051] e、计算方法

以校准品浓度对相应 ΔA 拟合校准曲线,样本浓度值通过校准曲线得出。其中图3为本发明实施例中Lp-PLA2的标准曲线。

[0052] 传统免疫比浊的检测方法如下:

1活化剂配制:

准确称取EDC,并用MES缓冲液配制成10mg/mL的溶液;准确称取S-NHS,并用MES缓冲液配制成50mg/mL的溶液。

[0053] 2活化

依次向1g/mL胶乳溶液中加入S-NHS溶液和EDC溶液,快速混匀,置于恒温培养摇床中活化20min(150 rpm,温度25℃)。

[0054] 3偶联

3.1抗体溶液配制

量取和胶乳溶液等体积的MES缓冲液,向其中加入(Lp-PLA2)抗体,混匀。

[0055] 3.2抗体偶联

将活化好的胶乳溶液加入到抗体溶液中,快速混匀,置于恒温培养摇床中反应3h(150 rpm,温度25℃)。

[0056] 4封闭

向偶联完的胶乳溶液中加入封闭液,快速混匀,置于恒温培养摇床中反应1h(150 rpm, 温度25°C)。

[0057] 5清洗

5.1离心

将封闭后的胶乳抗体转移至相应规格的洁净离心管中,21000rpm离心15min,弃上清液。

[0058] 5.2复溶

向沉淀物中加入清洗缓冲液,超声重悬(30s/次,4次,至溶液中无肉眼可见胶乳颗粒),复溶为1g/mL的胶乳溶液;重复一次(离心-复溶-离心)。

[0059] 6重悬

向清洗后的沉淀物中加入胶乳保存液,超声重悬(30s/次,4次,至溶液中无肉眼可见胶乳颗粒)。

[0060] 7检验方法

R1(第一检测液):上机即用;R2(第二检测液):上机即用。

[0061] b、操作步骤

反应类型:两点终点法,温度:37°C,比色杯光径:1cm;

主波长:500-700nm 单位:ng/l;

取6个反应管,1个空白管,5个样本管;

I 分别加入R1180ul,再加入10 ul样本(空白管加纯水,样本管分别加入样本1-5),温育2min;

II 分别加入R2 60ul,反应5min;

混匀,37°C孵育30s,读取各管吸光度A1,再孵育4.5分钟,读取各管吸光度A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$;

校准程序:采用多点校准模式,用纯化水为零点,依次对校准品进行定标测定,建立工作曲线。

[0062] 校准和质控:具有相同方法学的所有校准品和质控品均可使用。

[0063] 计算方法:以校准品浓度对相应 ΔA 拟合校准曲线,样本浓度值通过校准曲线得出。图3为Lp-PLA2的标准曲线。

[0064] 分别用本发明实施例的检测方法与传统免疫比浊的方法进行检测,线性、重复度、准确性的检测结果如下表:

1.1 线性检测结果见下表1、表2,其对应的拟合曲线见图1、图2。

[0065] 表 1、线性测试数据(本发明检测法)

样本	重复次数	测试结果 (ng/mL)	均值 (ng/mL)	稀释浓度 (ng/mL)	回归值 (ng/mL)	绝对/相对偏差	r
样本 1	1	-0.6	-0.32	0.2	-3.5	3.15	0.9993
	2	-0.1					
	3	-0.3					
样本 2	1	377.9	400.57	401	406.7	-1.51%	
	2	414.6					
	3	409.2					
样本 3	1	865.4	838.33	801.9	817.0	2.61%	
	2	854.0					
	3	795.6					
样本 4	1	1220.0	1190.40	1202.7	1227.2	-3.00%	
	2	1154.5					
	3	1196.7					
样本 5	1	1726.5	1655.83	1603.5	1637.4	1.13%	
	2	1614.1					
	3	1626.9					

表 2、线性测试数据 (传统免疫比浊检测的方法)

样本	重复次数	测试结果 (ng/mL)	均值	稀释浓度	回归值	绝对/相对 偏差	r
			(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)		
样本 1	1	0.0	-0.12	0.2	-52.9	52.76	0.9921
	2	0.0					
	3	-0.4					
样本 2	1	374.3	381.13	401	387.4	-1.62%	
	2	382.7					
	3	386.4					
样本 3	1	826.3	792.27	801.9	827.8	-4.29%	
	2	775.3					
	3	775.2					
样本 4	1	1162.5	1147.00	1202.7	1268.1	-9.55%	
	2	1196.7					
	3	1081.8					
样本 5	1	1860.5	1818.57	1603.5	1708.4	6.45%	
	2	1895.1					
	3	1700.1					

小结:从上述可以看出,本发明检测法的线性范围更宽。

[0066] 1.2重复性检测结果见下表3、表4。

[0067] 表 3、重复性测试数据 (本发明检测法)

重复次数	测试结果 (ng/mL)	
	低值样本	高值样本
1	95.2	521.6
2	105.2	465.9
3	104.6	485.2
4	104.4	518.6
5	104.3	468.8
6	103.9	490.6
7	96.7	498.4
8	100.3	502.7
9	102.9	506.1
10	103.3	511.8
M	102.08	496.97
SD	3.517	19.295
CV	3.45%	3.88%

表 4、重复性测试数据(传统免疫比浊检测的方法)

重复次数	测试结果 (ng/mL)	
	低值样本	高值样本
1	93.8	472.7
2	96.2	507.4
3	97.1	530.2
4	96.6	457.9
5	108.8	520.7
6	108.8	474.2
7	96.7	529.1
8	105.0	480.4
9	99.6	527.0
10	105.0	500.9
M	100.76	500.05
SD	5.608	26.955
CV	5.57%	5.39%

小结:从上述结果可以看出,本发明检测法的重复性更好。

[0068] 1.3准确度检测结果见下表5、表6。

[0069] 表 5、准确度测试数据(本发明检测法)

样本	重复次数	20150823			
		测试结果 (ng/mL)	均值 (ng/mL)	标定浓度 (ng/mL)	偏差
低值样本	1	105.3	102.7	101.4	1.31%
	2	104.7			
	3	98.2			
中值样本	1	249.6	256.3	249.1	2.88%
	2	260.1			
	3	259.1			
高值样本	1	494.8	485.7	502.3	-3.30%
	2	479.2			
	3	483.1			

表 6、准确度测试数据 (传统免疫比浊检测的方法)

样本	重复次数	测试结果 (ng/mL)	均值 (ng/mL)	标定浓度 (ng/mL)	偏差
低值样本	1	93.3	96.2	101.4	-5.13%
	2	103.1			
	3	92.2			
中值样本	1	260.9	263.6	249.1	5.83%
	2	265.1			
	3	264.9			
高值样本	1	525.8	527.1	502.3	4.93%
	2	514.5			
	3	540.9			

小结:从上述结果可以看出,本发明检测法准确性高于传统的比浊检测法。

[0070] 抗干扰性检测

1抗内源性干扰物干扰

本测试主要评价高胆红素、高血红蛋白、高血脂对Lp-PLA2试剂盒测定的影响。

[0071] 1.1抗胆红素干扰

1.1.1胆红素干扰样本的制备

准备 (100±10) ng/mL、(500±50) ng/mL两个浓度的Lp-PLA2血清样本。

[0072] 称取0.200 g 胆红素溶解于1.0 mL 0.1 M NaOH中,配制成浓度为2000 mg/dL的胆红素母液;

将0.10 mL的胆红素母液加入0.90mL的低、高值Lp-PLA2血清样本中,混合均匀,制备成胆红素终浓度为200 mg/dL的干扰样本;

将0.10 mL 0.1 M NaOH加入0.90 mL的低、高值Lp-PLA2血清样本中,混合均匀,制备成对照样本。

[0073] 1.1.2样品测定

用同一批次试剂分别测定添加不同干扰物的样品,重复2次,按式(1)计算干扰样品的测量均值与对照样品测量均值的相对偏差(B),结果的相对偏差(B)应不超过±10%。

[0074]
$$B = \frac{M_I - M}{M} \times 100\% \text{-----} (1)$$

式中：

B —相对偏差；

M —对照样本2次测定结果的均值；

M_I —干扰样本2次测定结果的均值。

[0075] 1.2抗血红蛋白干扰

1.2.1血红蛋白干扰样本的制备

准备(100±10) ng/mL、(500±50) ng/mL两个浓度的Lp-PLA2血清样本。

[0076] 准备100 g/L血红蛋白储存液：收取5mL肝素化全血，离心10分钟(22℃, 3000 rpm)收集血细胞沉淀；向血细胞沉淀中加入等渗生理盐水，颠倒混合10次，离心10分钟(22℃, 3000 rpm)，弃上清，此步骤重复两次；向洗涤后的血细胞沉淀中加入5mL去离子水，颠倒混合10次，置于-15℃~-20℃冰箱过夜；第二天取出融解。冻融使血细胞破坏，血红蛋白释放，离心30分钟(22℃, 3000 rpm)，上清即溶有血红蛋白，用血液分析仪测定血红蛋白浓度，并用生理盐水将浓度调至100g/L；

将0.03 mL的血红蛋白储存液加入0.97 mL低、高值Lp-PLA2血清样本中，混合均匀，制备成血红蛋白终浓度为3.0 g/L的干扰样本；

将0.03 mL的生理盐水加入0.97 mL的低、高值Lp-PLA2血清样本中，混合均匀，制备成对照样本。

[0077] 1.2.2样本测定

用同一批次试剂分别测定添加不同干扰物的样品，重复2次，按式(1)计算干扰样品的测量均值与对照样品测量均值的相对偏差(B)，结果的相对偏差(B)应不超过±10%。

[0078] 1.3抗血脂干扰

1.3.1血脂干扰样本的制备

准备(100±10) ng/mL、(500±50) ng/mL两个浓度的Lp-PLA2血清样本。

[0079] 称取0.200 g 甘油三酯溶解于1.0 mL 生理盐水中，配制成浓度为200 g/L的甘油三酯母液；

将0.01 mL甘油三酯加入0.99 mL低、高值Lp-PLA2血清样本中，混合均匀，制备成甘油三酯浓度为2.0 g/L的干扰样本；

将0.01 mL的生理盐水加入0.99 mL的低、高值Lp-PLA2血清样本中，混合均匀，制备成对照样本。

[0080] 1.3.2样本测定

用同一批次试剂分别测定添加不同干扰物的样品，重复2次，按式(1)计算干扰样品的测量均值与对照样品测量均值的相对偏差(B)，结果的相对偏差(B)应不超过±10%。

[0081] 1.4抗类风湿因子(Rheumatoid Factor, RF)干扰

1.4.1抗RF干扰样本准备

取正常人新鲜血清作为基础样本；

将1.0. mL RF血清直接作为RF阳性样本，即制成终浓度为500 IU/mL的RF阳性样本；

用正常人新鲜血清将Lp-PLA2抗原梯度稀释，得到终浓度约为3000 ng/mL和8000 ng/mL的样本；

准备0.95mL基础样本两份，分别添加50μL浓度约为3000ng/mL和8000 ng/mL的样本，制

成基础添加样本1、2；

同时准备0.95mL RF阳性样本两份，分别添加50 μL浓度约为3000 ng/mL和8000 ng/mL的样本，制成RF阳性添加样本1、2。

[0082] 1.4.2样本测定

用同一批次试剂对基础样本、RF阳性样本、两个基础添加样本和两个RF阳性添加样本分别重复测定2次，按式(2)计算相对偏差(B)，结果的相对偏差(B)应不超过±10%。

$$[0083] \quad B = [(Y_i - Y) / (X_i - X) - 1] \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

式中：

B—相对偏差；

X—基础样本浓度均值；

Y—RF阳性样本浓度均值；

X_i —基础添加样本*i*浓度均值(*i*=1、2)；

Y_i —RF阳性添加样本*i*浓度均值(*i*=1、2)。

[0084] 1.5抗人抗鼠抗体(Human Antimouse Antibody,HAMA)干扰

1.5.1抗HAMA干扰样本准备

取正常人新鲜血清作为基础样本；

测试中使用冻干状态的HAMA阳性血清1和HAMA阳性血清2L。使用时，分别加入1 mL去离子水充分溶解，得到高浓度的HAMA阳性血清1和HAMA阳性血清2L，然后分别稀释成3μg/mL的高浓度母液；

将HAMA阳性血清1和HAMA阳性血清2L的高浓度母液各150μL添加到2.7mL基础样本中，制成终浓度为600ng/mL的HAMA阳性样本；

用正常人新鲜血清将Lp-PLA2抗原梯度稀释，得到终浓度约为3000 ng/mL和8000 ng/mL的样本；

准备0.95mL基础样本两份，分别添加50μL浓度约为3000 ng/mL和8000 ng/mL的样本，制成基础添加样本1、2；

同时准备0.95mL HAMA阳性样本两份，分别添加50μL浓度约为3000 ng/mL和8000 ng/mL的样本，制成HAMA阳性添加样本1、2。

[0085] 1.5.2样本测定

用同一批次试剂对基础样本、HAMA阳性样本、两个基础添加样本和两个HAMA阳性添加样本分别重复测定2次，按式(2)计算相对偏差(B)，结果的相对偏差(B)应不超过±10%。

[0086] 性能评估结果

抗内源性干扰物干扰测试结果见表7。

[0087] 表 7、抗内源性干扰物干扰—测试数据

干扰物	样本	干扰物浓度	重复次数	批次1		批次2		批次3	
				测试结果 (ng/mL)	均值 偏差	测试结果 (ng/mL)	均值 偏差	测试结果 (ng/mL)	均值 偏差
甘油三酯	低值样本	■	1	99.3	97.8 2.60%	182.7	185.4 188.6	97.8	181.4 -1.87%
			2	98.6		185.4		99.1	
			3	95.2		93.8		187.4	
		2.8μg/L	1	188.8	188.4 -0.21%	181.9	188.8 96.8	188.6	96.7 -1.87%
			2	184.5		188.8		94.1	
			3	95.8		94.5		95.4	
	高值样本	■	1	478.7	494.9 -3.12%	525.6	485.4 509.9	499.9	528.5 -6.82%
			2	485.5		485.4		528.5	
			3	528.6		522.7		594.8	
		2.8μg/L	1	475.2	489.4 -2.88%	525.8	512.5 519.1	491.2	495.5 -0.87%
			2	512.5		512.5		488.4	
			3	488.5		521.8		594.2	
胆固醇	低值样本	■	1	188.4	97.8 4.88%	185.1	95.5 98.5	96.8	182.6 1.87%
			2	97.2		95.5		188.8	
			3	95.3		96.8		182.1	
		288μg/dL	1	96.5	181.6 -1.11%	181.1	181.2	99.5	183.7 1.68%
			2	187.4		98.5		185.2	
			3	188.9		184.8		188.3	
	高值样本	■	1	534.8	504.8 -5.12%	491.4	482.5 493.9	487.1	488.7 -0.21%
			2	587.2		482.8		482.5	
			3	482.3		487.6		528.8	
		288μg/dL	1	488.6	483.8 -1.02%	518.8	485.9	487.2	494.9 1.68%
			2	515.8		486.8		523.8	
			3	484.6		496.8		489.5	
血清蛋白	低值样本	■	1	99.4	99.8 0.27%	187.6	185.6 185.7	96.8	185.5 -0.05%
			2	95.8		185.6		188.6	
			3	185.7		97.8		188.5	
		3.8μg/L	1	94.4	99.9 -5.99%	186.8	185.2	187.2	181.2 -3.24%
			2	97.9		182.8		93.5	
			3	187.4		99.9		182.8	
	高值样本	■	1	488.5	489.9 -0.29%	587.2	505.1	495.8	488.2 -0.14%
			2	473.2		508.2		491.2	
			3	478.8		499.9		489.5	
		3.8μg/L	1	511.4	509.1 -0.45%	457.9	482.3	498.4	498.8 0.01%
			2	529.9		484.1		585.4	
			3	486.1		584.8		492.1	

抗RF干扰测试结果见表8。

[0088] 表8、抗RF干扰—测试数据

干扰物浓度 (IU/mL)	样本	批次1		批次2		批次3	
		测试结果 (ng/mL)	均值 偏差	测试结果 (ng/mL)	均值 偏差	测试结果 (ng/mL)	均值 偏差
50000μL	基础样本	188.6	182.85 -3.08%	87.9	85.85 -2.33%	182.7	188.38 3.00%
		188.7		88.1		86.7	
		152.6		158.3		154.9	
	基础样本+1	153.5	151.85 -1.04%	154.9	151.48 -2.22%	154.3	144.55 -6.39%
		188.5		188.3		188.1	
		188.4		85.7		86.1	
	RF阳性样本	188.6	184.35 -2.78%	153.4	151.48 -1.31%	155.9	145.85 -6.45%
		158.8		158.4		154.9	
		158.7		158.4		152.4	
	基础样本	187.1	181.55 -3.00%	85.4	84.15 -1.50%	182.4	88.35 -5.13%
		86.9		184.9		86.1	
		533.5		483.9		483.7	
	基础样本+2	478.7	486.8 1.78%	586.8	588.25 0.23%	523.5	488.38 -6.13%
		188.5		188.9		185.4	
		188.9		185.4		184.7	
	RF阳性样本	587.1	484.85 -16.81%	485.4	511.85 6.41%	484.6	478.38 -1.33%
		488.6		526.9		471.8	

抗HAMA干扰测试结果见表9。

[0089] 表 9、抗HAMA干扰—测试数据

样本	批次1			批次2			批次3		
	测试时间 (eq/mL)	均值	偏差	测试时间 (eq/mL)	均值	偏差	测试时间 (eq/mL)	均值	偏差
空白样本	304.4 306.5	100.45	5.63%	302.5 306.5	100.00	-3.80%	303.1 306.5	100.70	-3.83%
空白加样本1	305.7 307.0	100.30		303.0 308.0	100.40		303.7 308.0	100.50	
UAMA阳性样本	306.0 308.5	100.35		302.5 307.0	100.70		306.0 307.5	100.35	
UAMA阴性加样本1	305.1 304.5	100.30		303.3 303.5	100.40		305.5 306.4	100.45	
空白样本	306.2 306.4	100.30	5.13%	303.5 302.5	97.00	-4.70%	305.1 307.0	100.50	3.35%
空白加样本1	306.4 401.1	400.35		304.0 303.7	500.35		304.3 400.0	400.35	
UAMA阳性样本	307.0 307.6	100.35		306.5 306.0	100.25		306.4 306.0	100.35	
UAMA阴性加样本1	401.5 307.0	400.35		400.6 306.5	500.35		402.3 306.1	500.35	

小结:通过对试剂的抗干扰性测试,结果表明,本发明抗干扰能力强。

[0090] 综上所述,本发明提供一种提升免疫比浊法准确性的方法,本方法采用磁珠来偶联抗体,通过磁场来快速分离,缩短偶联时间,避免了因为离心而带来的凝聚现象,提高了偶联效率;本方法采用一种或多种粒径的磁珠来进行偶联,优选的采用多粒径的磁珠进行偶联,因为多粒径相对比单粒径偶联,检测的灵敏性和特异性更高;免疫比浊法极易受到溶血、脂肪血的影响而导致结果不准确,本发明中,样本与磁珠-抗体复合物反应后(抗体成功捕获抗原后),应用磁场快速分离,弃掉上清,加入缓冲液重悬复合物,再进行检测,避免了样本的因素而导致的的结果不准确。

[0091] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

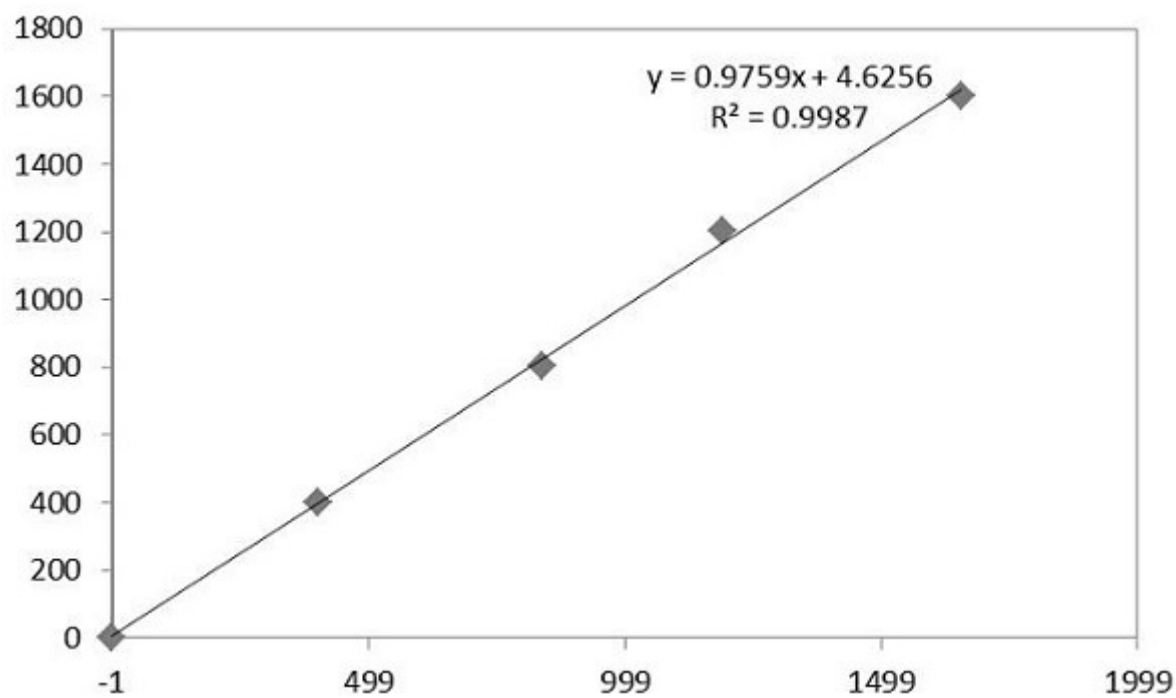


图1

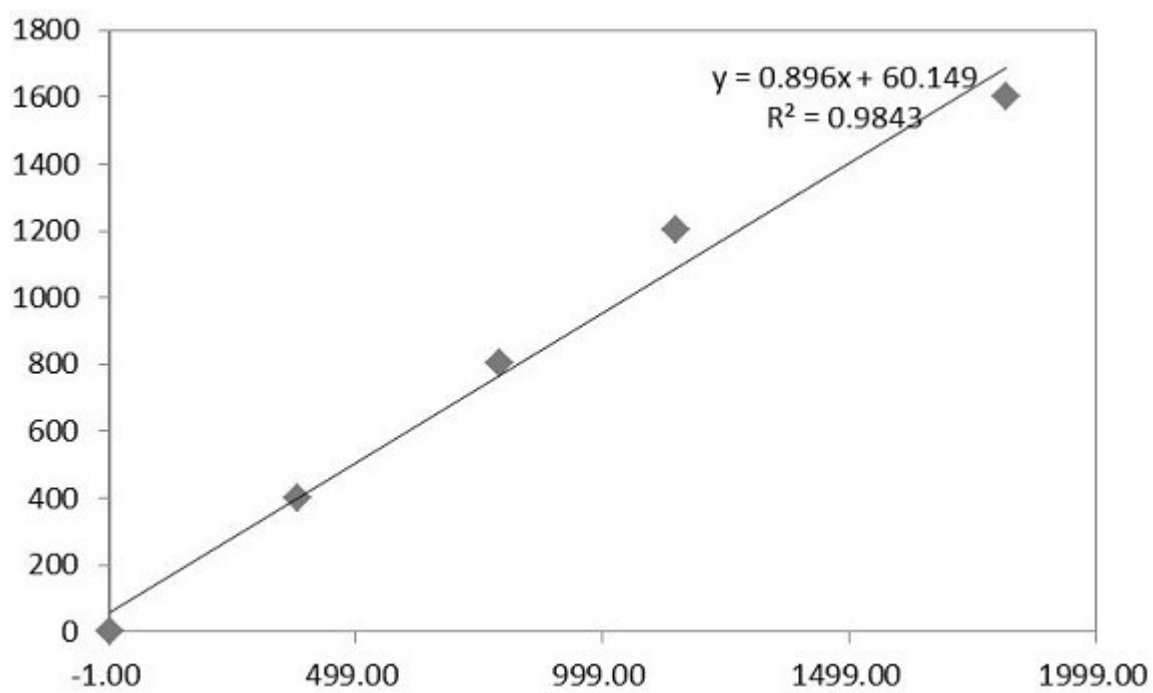


图2

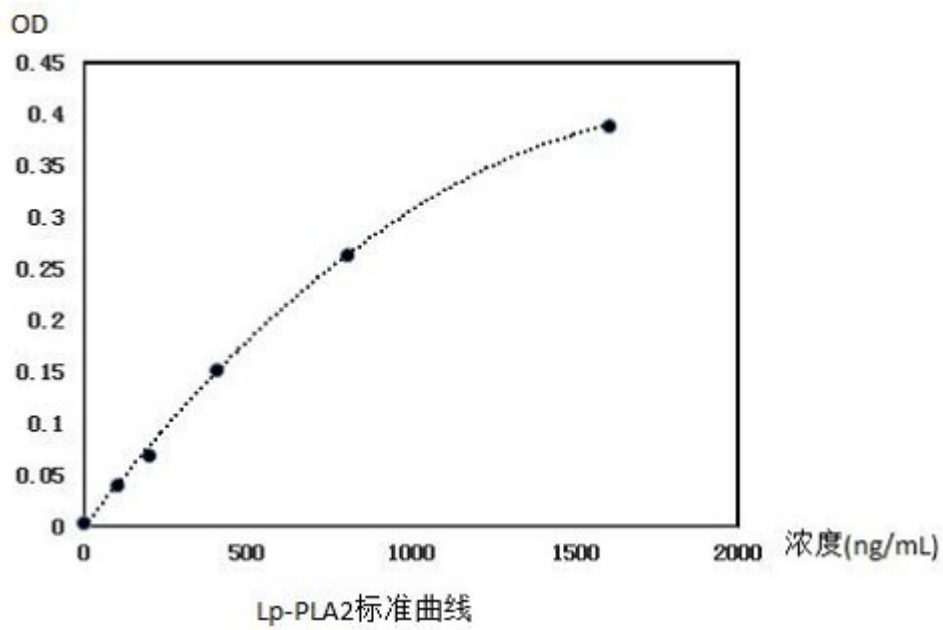


图3

专利名称(译)	一种提升免疫比浊法准确性的方法		
公开(公告)号	CN109541201A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811612512.8	申请日	2018-12-27
申请(专利权)人(译)	海格德生物科技(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	海格德生物科技(深圳)有限公司		
[标]发明人	卢岳军 陈雪 仇家舟 钟运华 陈晶晶		
发明人	卢岳军 陈雪 仇家舟 钟运华 陈晶晶		
IPC分类号	G01N33/537 G01N21/82		
CPC分类号	G01N33/537 G01N21/82		
代理人(译)	张绍波		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种提升免疫比浊法准确性的方法。本方法采用磁珠来偶联抗体，通过磁场来快速分离，缩短偶联时间，避免了因为离心而带来的凝聚现象，提高了偶联效率；本方法采用一种或多种粒径的磁珠来进行偶联，优选的采用多粒径的磁珠进行偶联，因为多粒径相对比单粒径偶联，检测的灵敏性和特异性更高；免疫比浊法极易受到溶血、脂肪血的影响而导致结果不准确，本发明中，样本与磁珠-抗体复合物反应后（抗体成功捕获抗原后），应用磁场快速分离，弃掉上清，加入缓冲液重悬复合物，再进行检测，避免了样本的因素而导致的结果不准确。

