



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110850076 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911189903.8

(22)申请日 2019.11.28

(71)申请人 南京迪安医学检验所有限公司

地址 210000 江苏省南京市江宁区东山街
道东麒路6号东山国际企业研发园B2
栋

(72)发明人 冯涛 陈国动 周慧 张楠
朱红甜

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定
试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用,所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品;所述化学发光标记物为异鲁米洛或异硫氰酸异鲁米洛;所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的Fe₃O₄。利用本发明所述抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒进行抗体检测,灵敏度高,重现性好,准确度高,并且成本低,操作简单。

1. 一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品;

所述化学发光标记物为异鲁米洛或异硫氰酸异鲁米洛;所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 。

2. 根据权利要求1所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,其特征在于,所述纳米磁微球的粒径为50-500nm。

3. 根据权利要求1或2所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包括双氧水溶液和对苯苯酚溶液。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,其特征在于,所述双氧水溶液的质量百分比浓度为0.01-0.2%;

优选地,所述对苯苯酚溶液的质量百分比浓度为0.001-0.1%。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,其特征在于,所述抗双链DNA抗体IgG定标品用标准品缓冲液将抗双链DNA抗体IgG配制成为浓度为0IU/mL、20IU/mL、40IU/mL、80IU/mL、160IU/mL、320IU/mL,4℃保存备用。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒的制备方法,所述制备方法包括:生物素化的双链DNA抗原的制备;链亲和素包被的纳米磁微球的制备;异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体的制备;化学发光底物液的配制,以及抗双链DNA抗体IgG定标品的制备。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述生物素化的双链DNA抗原的制备方法为:暗室中,取dsDNA和光敏生物素按比例混匀,高压汞灯照射15-20min,期间每隔3-5min混匀一次;正常光照下,用2倍体积正丁醇萃取两次,每次离心13000g离心5min,去上清;后加入2.5倍体积的-20℃预冷的无水乙醇,-20℃静置过夜,13000g离心10min,去上清,沉淀用75%乙醇洗涤1次,沉淀干燥后复溶,得到所述生物素化的双链DNA抗原。

8. 根据权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于,所述链亲和素包被的纳米磁微球的制备方法为:取柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 纳米磁珠悬浮液,磁分离去上清,MES缓冲液重悬,加入EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入链酶亲和素,室温下混悬2-10h,磁分离,去除上清,Tris缓冲液重悬,得到链酶亲和素包被的磁微粒;

优选地,所述异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体的制备方法为:取鼠抗人IgG单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入异鲁米洛混匀,室温下避光反应,1-2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人IgG单克隆抗体的异鲁米洛溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人IgG单克隆抗体的异鲁米洛标记物。

9. 根据权利要求6-8中任一项所述的制备方法,其特征在于,所述化学发光底物液的配制方法为:将双氧水与表面活性剂加入至纯化水中,配制得到双氧水质量百分比浓度为0.01-0.2%的溶液;将对苯苯酚和防腐剂以及表面活性剂加入至纯化水中,得到对苯苯酚溶液的质量百分比浓度为0.001-0.1%的溶液。

优选地,所述抗双链DNA抗体IgG定标品的制备方法为:用标准品缓冲液将抗双链DNA抗体IgG配置成浓度为0IU/mL、20IU/mL、40IU/mL、80IU/mL、160IU/mL、320IU/mL,分装冻干,4

℃保存备用。

10. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒在抗双链DNA抗体IgG检测中的应用。

一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,涉及一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 双链脱氧核糖核酸(double stranded DNA,dsDNA)抗体是一种能够与天然DNA结合的自身抗体。在绝大多数系统性红斑狼疮(SLE)患者的血清中均存在该抗体,其与SLE的病理变化、活动性、疗效及预后有很密切的关系。

[0003] 因此,对于抗双链DNA抗体IgG的检测成为SLE诊断、以及病情追踪和预后判断等具有重要意义。

[0004] 在本领域中,检测抗双链DNA抗体IgG的方法常见的为酶联免疫吸附法,但是其存在一些不足,例如使用的试剂多,操作复杂,并且容易引起各种试剂之间的交叉污染而影响检测结果准确性,采用人工操作,试剂或样品的取用量不是很精确等。

[0005] 因此,在本领域期望开发一种操作简单、成本低、重现性好、检测灵敏度高的抗双链DNA抗体IgG检测的方法。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用。利用本发明所述抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒进行抗体检测,灵敏度高,重现性好,准确度高,并且成本低,操作简单。

[0007] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一方面,本发明提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品;

[0009] 所述化学发光标记物为异鲁米洛或异硫氰酸异鲁米洛;所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的Fe₃O₄。

[0010] 在本发明中,选用异鲁米洛或异硫氰酸异鲁米洛作为化学发光标记物,该化学发光标记物能够产生激发态的产物,这种产物衰变至低能态的同时释放出光子,增强化学发光,从而应用于化学发光免疫分析系统,不需要酶的参与,并且可以提高检测的灵敏度。

[0011] 优选地,所述纳米磁微球的粒径为50-500nm,例如50nm、80nm、100nm、150nm、180nm、200nm、230nm、250nm、280nm、300nm、350nm、380nm、400nm、450nm、480nm或500nm。

[0012] 优选地,所述化学发光底物液包括双氧水(H₂O₂)溶液和对苯苯酚溶液。

[0013] 在本发明中选择双氧水(H₂O₂)溶液和对苯苯酚溶液组成化学发光底物液,能够辅助化学发光标记物提高发光强度和持续时间,得到增强型化学发光。

[0014] 优选地,所述双氧水溶液的质量百分比浓度为0.01-0.2%,例如0.01%、0.015%、

0.02%、0.025%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.12%、0.14%、0.16%、0.18%或0.2%。

[0015] 优选地,所述对苯苯酚溶液的质量百分比浓度为0.001-0.1%,例如0.001%、0.003%、0.005%、0.008%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%或0.1%。

[0016] 在本发明中,所述抗双链DNA抗体IgG定标品用标准品缓冲液将抗双链DNA抗体IgG配制成浓度为0IU/mL、20IU/mL、40IU/mL、80IU/mL、160IU/mL、320IU/mL,4℃保存备用。

[0017] 另一方面,本发明提供了如上所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒的制备方法,所述制备方法包括:生物素化的双链DNA抗原的制备;链亲和素包被的纳米磁微球的制备;异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体的制备;化学发光底物液的配制,以及抗双链DNA抗体IgG定标品的制备。

[0018] 优选地,所述生物素化的双链DNA抗原的制备方法为:暗室中,取dsDNA和光敏生物素按比例混匀,高压汞灯照射15-20min,期间每隔3-5min混匀一次;正常光照下,用2倍体积正丁醇萃取两次,每次离心13000g离心5min,去上清;后加入2.5倍体积的-20℃预冷的无水乙醇,-20℃静置过夜,13000g离心10min,去上清,沉淀用75%乙醇洗涤1次,沉淀干燥后复溶,得到所述生物素化的双链DNA抗原。

[0019] 优选地,所述链亲和素包被的纳米磁微球的制备方法为:取柠檬酸修饰的Fe₃O₄纳米磁珠悬浮液,磁分离去上清,MES缓冲液重悬,加入EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入链酶亲和素,室温下混悬2-10h,磁分离,去除上清,Tris缓冲液重悬,得到链酶亲和素包被的磁微粒;

[0020] 优选地,所述异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体的制备方法为:取鼠抗人IgG单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入异鲁米洛混匀,室温下避光反应,1-2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人IgG单克隆抗体的异鲁米洛溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人IgG单克隆抗体的异鲁米洛标记物。

[0021] 优选地,所述化学发光底物液的配制方法为:将双氧水与表面活性剂加入至纯化水中,配制得到双氧水质量百分比浓度为0.01-0.2%的溶液;将对苯苯酚和防腐剂以及表面活性剂加入至纯化水中,得到对苯苯酚溶液的质量百分比浓度为0.001-0.1%的溶液。

[0022] 优选地,所述抗双链DNA抗体IgG定标品的制备方法为:用标准品缓冲液将抗双链DNA抗体IgG配置成浓度为0IU/mL、20IU/mL、40IU/mL、80IU/mL、160IU/mL、320IU/mL,分装冻干,4℃保存备用。

[0023] 另一方面,本发明提供了如上所述的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒在抗双链DNA抗体IgG检测中的应用。

[0024] 本发明所述的试剂盒可以用于抗双链DNA抗体IgG检测,其检测灵敏度高达0.5-1IU/mL。

[0025] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0026] 本发明选用异鲁米洛或异硫氰酸异鲁米洛作为化学发光标记物,该化学发光标记物能够产生激发态的产物,这种产物衰变至低能态的同时释放出光子,增强化学发光,从而应用于化学发光免疫分析系统,不需要酶的参与,并且选择双氧水(H₂O₂)溶液和对苯苯酚

溶液组成化学发光底物液,能够辅助化学发光标记物提高发光强度和持续时间,得到增强型化学发光,可将检测的灵敏度提高至0.5IU/mL,免疫检测的线性范围宽,能达到0.5-400IU/mL,重复性高,批内及批间差均在5%以内,操作简便,减少人为误差。

具体实施方式

[0027] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0028] 实施例1

[0029] 在本实施例中,提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品;

[0030] 所述化学发光标记物为异鲁米洛;所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 ;所述纳米磁微球的粒径为50-500nm,化学发光底物液包括质量百分比浓度为0.1%的双氧水溶液和质量百分比浓度为0.05%的对苯苯酚溶液。

[0031] 所述试剂盒中各成分的制备方法如下:

[0032] (1)生物素化的双链DNA抗原的制备:暗室中,取dsDNA和光敏生物素按比例混匀,高压汞灯照射15min,期间每隔5min混匀一次;正常光照下,用2倍体积正丁醇萃取两次,每次离心13000g离心5min,去上清;后加入2.5倍体积的-20℃预冷的无水乙醇,-20℃静置过夜,13000g离心10min,去上清,沉淀用75%乙醇洗涤1次,沉淀干燥后复溶,得到所述生物素化的双链DNA抗原。

[0033] (2)链亲和素包被的纳米磁微球的制备:取柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 纳米磁珠悬浮液,磁分离去上清,MES缓冲液重悬,加入EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入链酶亲和素,室温下混悬2-10h,磁分离,去除上清,Tris缓冲液重悬,得到链酶亲和素包被的磁微粒;

[0034] (3)异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体的制备:取鼠抗人IgG单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入异鲁米洛混匀,室温下避光反应,1h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人IgG单克隆抗体的异鲁米洛溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人IgG单克隆抗体的异鲁米洛标记物。

[0035] (4)化学发光底物液的配制:将双氧水与表面活性剂加入至纯化水中,配制得到双氧水质量百分比浓度为0.1%的溶液;将对苯苯酚和防腐剂以及表面活性剂加入至纯化水中,得到对苯苯酚溶液的质量百分比浓度为0.05%的溶液。

[0036] (5)抗双链DNA抗体IgG定标品的制备:用标准品缓冲液将抗双链DNA抗体IgG配置成浓度为0IU/mL、20IU/mL、40IU/mL、80IU/mL、160IU/mL、320IU/mL,分装冻干,4℃保存备用。

[0037] 实施例2

[0038] 在本实施例中,提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品;

[0039] 所述化学发光标记物为异硫氰酸异鲁米洛;所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的

Fe₃O₄;所述纳米磁微球的粒径为50-500nm,化学发光底物液包括质量百分比浓度为0.2%的双氧水溶液和质量百分比浓度为0.1%的对苯苯酚溶液。

[0040] 其制备方法与实施例1相同。

[0041] 实施例3

[0042] 在本实施例中,提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品;

[0043] 所述化学发光标记物为异鲁米洛;所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的Fe₃O₄;所述纳米磁微球的粒径为50-500nm,化学发光底物液包括质量百分比浓度为0.005%的双氧水溶液和质量百分比浓度为0.05%的对苯苯酚溶液。

[0044] 其制备方法与实施例1相同。

[0045] 实施例4

[0046] 在本实施例中利用实施例1的试剂盒进行抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫检测,所述检测方法为:

[0047] 本发明以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,本发明的方法学模式为竞争法,即仪器依次加入20μL的样品、50μL的抗双链DNA抗体IgG单克隆抗体包被的磁颗粒以及50μL的抗双链DNA抗体IgG包被的异鲁米洛,反应10min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入50μL化学发光标记物中的双氧水溶液、50μL对苯苯酚溶液进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的抗双链DNA抗体IgG含量。

[0048] 以浓度为0IU/mL、20IU/mL、40IU/mL、80IU/mL、160IU/mL、320IU/mL标准品进行如上所述检测,得出标准曲线 $y=0.9952x+0.6544$,计算线性相关系数得到 $R^2=0.9985$,另外,该试剂盒对抗双链DNA抗体IgG样品检测的线性范围为0.5-400IU/mL。

[0049] 取浓度为20IU/mL及160IU/mL两个抗双链DNA抗体IgG样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%,证明本发明所述试剂盒的检测准确度高,重现性好。

[0050] 参照CLSI EP17-A实验方案,计算本发明所述试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.5IU/mL。

[0051] 实施例5

[0052] 在本实施例中,对实施例1的试剂盒的稳定性进行评价,方法如下:

[0053] 对试剂盒分别进行4℃、12个月和37℃、7天的加速稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确度等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达12个月。

[0054] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

专利名称(译)	一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110850076A	公开(公告)日	2020-02-28
申请号	CN201911189903.8	申请日	2019-11-28
[标]发明人	冯涛 陈国动 周慧 张楠		
发明人	冯涛 陈国动 周慧 张楠 朱红甜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/5308		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法和应用，所述试剂盒包括生物素化的双链DNA抗原、链亲和素包被的纳米磁微球、异鲁米洛标记的鼠抗人IgG单克隆抗体、化学发光标记物、化学发光底物液、抗双链DNA抗体IgG定标品；所述化学发光标记物为异鲁米洛或异硫氰酸异鲁米洛；所述纳米磁微球为柠檬酸修饰的Fe₃O₄。利用本发明所述抗双链DNA抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒进行抗体检测，灵敏度高，重现性好，准确度高，并且成本低，操作简单。