



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106855570 A

(43)申请公布日 2017.06.16

(21)申请号 201611018767.2

(22)申请日 2016.11.21

(66)本国优先权数据

201620676522.8 2016.06.30 CN

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区南山街道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 郝建华 徐向红 王栋凯 郑燕萍  
马晓雯

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括:抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁微粒、抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的吖啶酯、抗肾小球基底膜抗体IgG定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒的制备方法。本发明所述试剂盒与现有试剂盒相比操作简便,灵敏度高,检测范围广等优点。

1. 一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括:抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的-纳米磁微球、化学发光标记物、化学发光底物液、抗肾小球基底膜抗体IgG定标品。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的固相载体为磁微粒。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的固相载体为羧基化的粒径为0.05~1μm磁微粒。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为吖啶酯、吖啶酯磺酰胺、吖啶酯甲苯磺酰胺、吖啶酯对甲基磺酰胺、吖啶酯三氟甲基磺酰胺。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物优选吖啶酯。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包括化学发光激发液、化学发光预激发液。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光预激发液为质量分数0.005%~0.5%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液,激发液为0.005moI/L~0.025moI/L的氢氧化钠(NaOH)溶液。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗肾小球基底膜抗体IgG定标品为用标准品缓冲液将抗肾小球基底膜抗体IgG配制成浓度为0 AU/mL、32.5 AU/mL、65 AU/mL、130 AU/mL、260 AU/mL、520 AU/mL,4℃保存备用。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁微粒的制备、抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯的制备、化学发光底物液的制备、抗肾小球基底膜抗体IgG定标品的制备。

10. 根据权利要求1和权利要求9所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁微粒的制备:

取羧基化的纳米磁珠悬浮液,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,加入抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体,室温下混悬2~10 h,磁分离,去除上清, Tris缓冲液重悬,得到抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁微粒;可选的,羧基化纳米磁珠直径为0.1μm~2.0μm;

MES缓冲液浓度为10mM~100mM, pH 5.5~8.5;

2) 抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯的制备:

取抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吖啶酯混匀,室温下避光反应,1~2 h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,最后加入得到的抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯;

3) 抗肾小球基底膜抗体IgG定标品的制备:

用标准品缓冲液将抗肾小球基底膜抗体IgG配置成浓度为0 AU/mL、32.5 AU/mL、65 AU/mL、130 AU/mL、260 AU/mL、520 AU/mL,分装冻干,4℃保存备用;

4) 化学发光预激发液的制备:

量取1.0升纯化水,依次加入0.5~100uL质量分数为20%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、0.5~5克防腐剂、0.5~5克表面活性剂,摇匀后避光存放;可选的,防腐剂为商品化叠氮化钠、PC300,

表面活性剂为吐温20、吐温80、Triton X100、Triton 405；

5) 化学发光激发液的制备：

量取1.0升纯化水，依次加入0.2 ~ 1克氢氧化钠、0.5 ~ 5克防腐剂、0.5 ~ 5克表面活性剂，摇匀后避光存放；

可选的，防腐剂为商品化叠氮化钠、PC300，表面活性剂为吐温20、吐温80、Triton X100、Triton 405。

## 一种抗肾小球基底膜抗体 IgG 化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断免疫检测领域,具体地,本发明提供了一种化学发光免疫检测抗肾小球基底膜抗体 IgG 试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 在解剖学构造上是上皮细胞和结缔组织之间的屏障, VI 胶原蛋白是 GBM 特有的胶原蛋白, 它和其他分子 (如层连蛋白、副层连蛋白) 一起构成基质。六条  $\alpha$ -链 (多肽, 含超过 1650 个氨基酸) 中, 每 3 条形成一个螺旋体, 构成了 VI 胶原蛋白结构的亚单位。

[0003] 抗肾小球基底膜相关疾病是指一组少见的循环中抗肾小球基底膜抗体在脏器中沉积的自身免疫性疾病。根据受累器官的不同, 可表现为肺出血肾炎综合征、急进性肾炎 (RPGN) I 型和较少见的单纯肺出血。此外, 近年发现在抗肾小球基底膜抗体阳性患者中约 30% 同时合并有抗中性粒细胞胞浆抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 阳性, 称为双抗体阳性。有报道发现前驱感染、吸烟、与碳氢化合物和某些挥发性化学溶剂 (如油漆、胶、杀虫剂等) 的接触史及吸入高浓度氧等因素可能是抗肾小球基底膜抗体相关疾病的诱因。

[0004] 在抗肾小球基底膜病的两个发病年龄高峰中, 第一个高峰在 20~30 岁之间, 多为单抗体阳性的患者, 男性多见; 第二个高峰在 60~70 岁, 多为双抗体阳性的患者, 女性多见。

[0005] 临床检测抗肾小球基底膜抗体 IgG 的主要方法为酶联免疫吸附法, 但该方法存在着下述的不足之处:

(1) 使用 12×8 型、6×8 型、8×12 型或整板型 96 孔专用微孔板作为抗原包被用具和反应容器, 在使用时只能分成 12 批次、6 批次、8 批次或整板一次使用, 无法进行独立的、单人份的检测;

(2) 定量测定所用的试剂种类较多, 每一种检测试剂都要用试剂瓶来盛装, 并且每使用一种试剂时都需要更换吸液嘴来分别加注到微孔板的微孔中, 不但试剂瓶种类多, 加注试剂的操作也极为繁琐;

(3) 缺少对检测信息的相应标注, 只能通过查看试剂盒外包装盒的标识才能了解或知悉检测试剂的生产批号及有效期信息, 而且所知悉的信息在检测过程中不受控, 具有很大的随意性;

(4) 检测试剂在检测过程中处于开放的空间, 容易引起各种试剂之间的交叉污染而影响检测结果的准确性;

(5) 检测过程多采用手工操作, 试剂或样本的加量不很精确, 操作过程极为繁琐和复杂, 容易发生操作差错, 检测结果的准确度和精密度较差;

(6) 在检测项目成套试剂的数量配置及使用上均为项目数 × 48/96 人份, 如果需要检测 10 个项目, 则试剂的配置及使用数须为 10 × 48/96 人份, 如果只有一份样本需要检测 10 个

不同的项目,也需要配置10×48/96人份的试剂,存在着不够经济合理的缺点。

## 发明内容

[0006] 目前抗肾小球基底膜抗体IgG检测技术存在以下缺点:检测成本高、检测灵敏度低、检测线性范围窄、重现性低、不能定量、操作复杂等。

[0007] 本发明正是为了克服以上所述缺点,公开了一种检测成本低、灵敏度高、检测线性范围广、重现性高、可以定量、操作简单的抗肾小球基底膜抗体IgG试剂盒及其制备方法。本发明首先制备化学发光免疫分析试剂盒,主要包括:抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁颗粒、抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的吖啶酯以及抗肾小球基底膜抗体IgG定标品;然后利用全自动化学发光免疫分析仪对定标品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件,测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度;最后对抗肾小球基底膜抗体IgG全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、精密度、干扰性)的评价。

[0008] 本发明与目前技术相比,具有以下优点:

1、本发明选择吖啶酯作为标记材料,并应用于化学发光免疫分析系统,该发光体系为直接化学发光,与传统的酶促化学发光相比,该反应不需要酶的参与,更加节约成本;

2、本发明选用的吖啶酯化学发光免疫分析系统检测灵敏度高,能够达到2.0 AU/mL;

3、本发明选用的吖啶酯化学发光免疫分析系统线性范围宽,能达到7-240 AU/mL;

4、本发明选用的吖啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

5、本发明的化学发光免疫分析系统已实现样本的定量,通过内置标准曲线到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的浓度值;

6、本发明的化学发光免疫分析系统已实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

[0009]

## 附图说明

[0010]

图1为实施例3得到的抗肾小球基底膜抗体IgG标准曲线图。

[0011]

## 具体实施方式

[0012]

实施例1:抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒制备方法

(1)抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的纳米磁珠制备:

取50mg羧基化的磁微粒(粒径为0.05-1μm)悬浮液,磁分离去上清,用0.02 M, pH为5.5 MES缓冲液重悬,加入0.5-2mL新配置的10 mg/mL的EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入3-5 mg 抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体,室温下混悬2-10 h,磁分离,去除上清,用含2% BSA 的0.1 M pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁颗粒,每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0013] (2) 抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯的制备：

取50  $\mu$ L 25mg/mL的抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物,加入150  $\mu$ L 0.1-0.2 M pH 9.0-9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入1-2  $\mu$ L 5 mg/mL的吖啶酯混匀,室温下避光反应,1-2 h后取出,用2 mL的zeba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,最后加入得到的抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到抗肾小球基底膜抗体IgG衍生物标记的吖啶酯,每瓶5 mL分装保存于4℃备用。

[0014] (3) 抗肾小球基底膜抗体IgG定标品的制备：

用标准品缓冲液(40 mM Tris-HCl, 0.5% BSA, 1% NaCl, pH 8.0)将抗肾小球基底膜抗体IgG配置成浓度为0 AU/mL、32.5 AU/mL、65 AU/mL、130 AU/mL、260 AU/mL、520 AU/mL,每瓶0.5 mL分装冻干,4℃保存备用。

[0015] (4) 化学发光预激发液的配制：

量取1.0升纯化水,依次加入80uL质量分数为20%的双氧水( $H_2O_2$ )、1.0克叠氮化钠、1.5克吐温20,摇匀后避光存放。

[0016] (5) 化学发光激发液的配制：

量取1.0升纯化水,依次加入0.6克氢氧化钠、0.5克PC300、0.5g叠氮化钠、1.5克Triton 405,摇匀后避光存放。

[0017] 实施例2:抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫检测方法：

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20  $\mu$ L的样品、50  $\mu$ L的抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁颗粒以及50  $\mu$ L的抗肾小球基底膜抗体IgG包被的吖啶酯,反应10 min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入50uL化学发光预激发液、50uL化学发光激发液进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的抗肾小球基底膜抗体IgG含量。

[0018] 实施例3:抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒性能评价

检测曲线见附图1。

[0019] 灵敏度的检测：

参照CLSI EP17-A 文件推荐实验方案,计算抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫层析试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为2.0AU/mL。

[0020] 线性的检测：

对浓度为0 AU/mL、32.5 AU/mL、65 AU/mL、130 AU/mL、260 AU/mL、520 AU/mL标准品做线性分析,计算线性相关系数,r=0.9990,另外,该试剂盒对抗肾小球基底膜抗体IgG样品检测的线性范围为7-240 AU/mL。

[0021] 精密度测定：

取浓度为25 AU/mL及150AU/mL两个抗肾小球基底膜抗体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%。

[0022] 干扰性实验：

取混合血清分别添加干扰物包括：结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白、抗坏血酸、甘油酯,添加比例按照 1: 20 进行,分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测

值,计算二者之间的偏差,以  $\pm 10\%$ 为可接受范围。结果表明,干扰性均达到 NCCLS 的文件标准,可用于临床实验室抗肾小球基底膜抗体 IgG 浓度的准确评估。

**[0023] 实施例4:抗肾小球基底膜抗体 IgG 化学发光免疫测定试剂盒的灵敏度实验**

分别用化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法对浓度为 0AU/mL 的校准品或样本稀释液为样本进行检测,重复测定 20 次,得出 20 次测量结果的 RLU 值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出  $M-2SD$ ,将该发光值代入校准曲线计算得到相应的浓度值小于 2.0AU/mL。

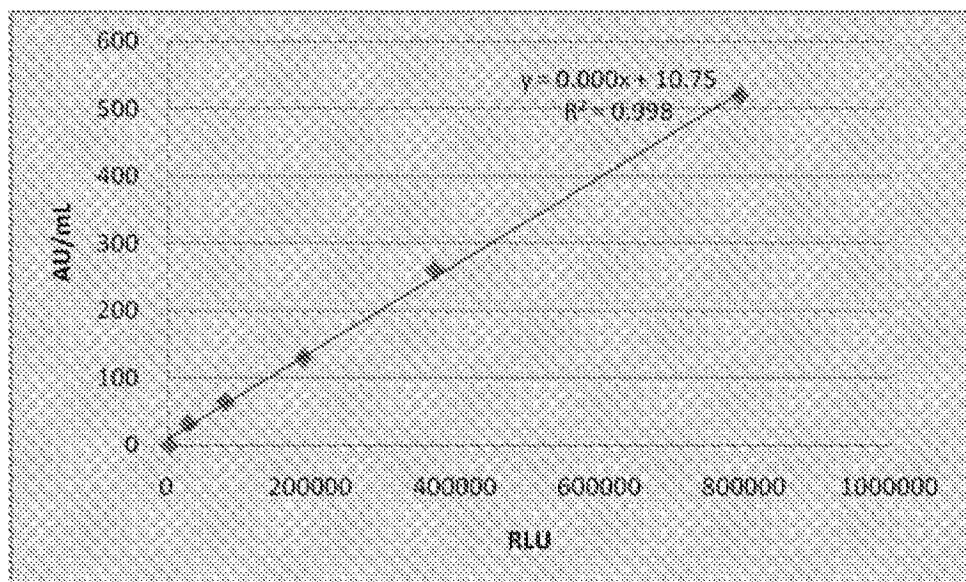


图1

专利名称(译)	一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106855570A</a>	公开(公告)日	2017-06-16
申请号	CN201611018767.2	申请日	2016-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	郝建华 徐向红 王栋凯 郑燕萍 马晓雯		
发明人	郝建华 徐向红 王栋凯 郑燕萍 马晓雯		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/54326 G01N33/577		
优先权	201620676522.8 2016-06-30 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明公开了一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒，所述试剂盒包括：抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的磁微粒、抗肾小球基底膜抗体IgG单克隆抗体包被的吖啶酯、抗肾小球基底膜抗体IgG定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种抗肾小球基底膜抗体IgG化学发光免疫测定试剂盒的制备方法。本发明所述试剂盒与现有试剂盒相比操作简便，灵敏度高，检测范围广等优点。

