



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109975539 A

(43)申请公布日 2019. 07. 05

(21)申请号 201910289154.X

(22)申请日 2019.04.11

(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 韩文斌 张金蕊 刘利晶 陈静
李彬

(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 33/535(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的
检验方法

(57)摘要

本发明公开了一种酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法,通过外观检查、空白孔观察、OD值批内范围和变异、OD值批间范围和变异、OD值降幅,对酶联免疫底物液、显色剂、终止液产品进行一系列检查,检验步骤清晰明了,操作简单,检验全面,检验结果真实可靠,且具有广泛的通用性,可对市场上所有的底物液、显色剂和终止液进行检验,适用范围广,且不用在每种试剂盒上单独检验,大量的节约了人力物力。

1. 一种酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法,其特征在于:包括下述具体步骤:

第一步,肉眼观察底物液、显色剂、终止液溶液外观,应为无色透明的澄清液体;

第二步,取酶免抗-HIV酶结合物,用 β 2-MG样品稀释液稀释成不同的3个浓度梯度,浓度从低到高分别定义为Q1、Q2、Q3;

第三步,分别取10u1第二步稀释好的Q1、Q2、Q3依次加入到空白酶标板中,然后每孔加入50u1底物液和50u1显色剂,震荡混匀后在37℃电热恒温培养箱中避光温育10分钟,然后每孔加入50u1终止液,震荡混匀后随即在酶标仪上使用450nm波长读数,放置30min后再次读数;

第四步,将第三步中读过数的包被板贴上板贴,放置在室温环境下过夜后,观察空白孔,应无色、无沉淀;

第五步,取第三步酶标仪0min和30min读取的待检试剂的OD值,分别计算Q1、Q2、Q3的均值,其均值应分别在 0.5 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.2 的范围内,并且计算变异应 $\leq 8\%$;

第六步,取第三步酶标仪0min和30min读取的待检和对照的OD值,计算Q1、Q2、Q3的均值,其均值应分别在 0.5 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.2 的范围内,并且计算变异应 $\leq 12\%$;

第七步,取第三步酶标仪0min和30min读取的待检的OD值,分别计算Q1、Q2、Q3的均值,不同时间OD值的变化幅度应 $\leq 15\%$ 。

酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂,尤其是涉及一种酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫试验用底物液、显色剂、终止液是体外诊断领域不可或缺的通用试剂。在酶联免疫反应中,当偶联物与固相载体上的抗原(抗体)反应结合后,需加上酶的相应底物,才能催化水解或氧化还原反应而呈现颜色,由此可见底物液、显色剂和终止液在整个酶联免疫反应中起着至关重要的作用。

[0003] 目前在酶联免疫试验中常用的底物液、显色剂和终止液的检验方法为在配套的试剂盒上使用精密性参考品检验,这种检验方法虽能确保在对应的试剂盒上符合要求,但存在明显的缺点:一是在配套的试剂盒上检验不仅浪费大量的人力物力,且不具有通用性;二是仅用精密性参考品检验会产生质控范围太窄的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法,该方法可对市场上所有的底物液、显色剂和终止液进行检验,适用范围广,可节省大量人力资源。

[0005] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法,包括下述具体步骤:

第一步,肉眼观察底物液、显色剂、终止液溶液外观,应无色透明的澄清液体;

第二步,取酶免抗-HIV酶结合物,用B2-MG样品稀释液稀释成不同的3个浓度梯度,浓度从低到高分别定义为Q1、Q2、Q3;

第三步,分别取10u1第二步稀释好的Q1、Q2、Q3依次加入到空白酶标板中,然后每孔加入50u1底物液和50u1显色剂,震荡混匀后在37℃电热恒温培养箱中避光温育10分钟,然后每孔加入50u1终止液,震荡混匀后随即在酶标仪上使用450nm波长读数,放置30min后再次读数;

第四步,将第三步中读过数的包被板贴上板贴,放置在室温环境下过夜后,观察空白孔,应无色、无沉淀;

第五步,取第三步酶标仪0min和30min读取的待检试剂的OD值,分别计算Q1、Q2、Q3的均值,其均值应分别在 0.5 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.2 的范围内,并且计算变异应 $\leq 8\%$;

第六步,取第三步酶标仪0min和30min读取的待检和对照的OD值,计算Q1、Q2、Q3的均值,其均值应分别在 0.5 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.2 的范围内,并且计算变异应 $\leq 12\%$;

第七步,取第三步酶标仪0min和30min读取的待检的OD值,分别计算Q1、Q2、Q3的均值,不同时间OD值的变化幅度应 $\leq 15\%$ 。

[0006] 本发明的优点在于方法简单,容易操作,具有广泛的通用性,可对市场上所有的底物液、显色剂和终止液进行检验,适用范围广,且不用在每种试剂盒上单独检验,大量的节约了人力物力。由于本发明涵盖了低、中、高三个质控点,通过OD值批内范围和变异、OD值批间范围和变异、OD值降幅等方面的控制,能严格保证酶联免疫用底物液、显色剂、终止液的质量。

具体实施方式

[0007] 下面通过具体实施例对本发明方法做更加详细的说明,以便于本领域技术人员的理解。

[0008] 实施例1 本发明所述的酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法,包括下述具体步骤:

第一步,外观检验:肉眼观察底物液、显色剂、终止液溶液外观,应为无色透明的澄清液体;

第二步,检验用质控盘调配:取市售的酶免抗-HIV酶结合物,用B2-MG样品稀释液按不同比例稀释成3个浓度梯度,按浓度从低到高分别定义为Q1、Q2、Q3;三个质控盘的浓度分别定义为0.5、1.0、2.0;

第三步,加样:按下表1所示的加样布局,分别取10u1第二步稀释好的Q1、Q2、Q3依次加入到空白酶标板中,然后每孔加入50u1底物液和50u1显色剂,震荡混匀后在37℃电热恒温培养箱中避光温育10分钟,然后每孔加入50u1终止液,震荡混匀后随即在酶标仪上使用450nm波长读数,放置30min后再次读数;

表1

BL	Q1	Q1	Q1	Q2	Q2	Q2	Q2	Q3	Q3	Q3	Q3	待 检
BL	Q1	Q1	Q1	Q2	Q2	Q2	Q2	Q3	Q3	Q3	Q3	
BL	Q1	Q1	Q1	Q2	Q2	Q2	Q2	Q3	Q3	Q3	Q3	对 照
BL	Q1	Q1	Q1	Q2	Q2	Q2	Q2	Q3	Q3	Q3	Q3	
BL:空白孔 Q1、Q2、Q3: 不同梯度的质控盘												

第四步,空白孔观察:将第三步中读过数的包被板贴上板贴,放置在室温环境下过夜后,观察空白孔,应无色、无沉淀;

第五步,OD值批内范围和变异:取第三步酶标仪0min和30min读取的待检试剂的OD值,分别计算Q1、Q2、Q3的均值,其均值应分别在 0.5 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.2 的范围内,并且计算变异应 $\leq 8\%$;

第六步,OD值批间范围和变异:取第三步酶标仪0min和30min读取的待检和对照的OD值,分别计算Q1、Q2、Q3的均值,其均值应分别在 0.5 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.2 的范围内,并且计算变异应 $\leq 12\%$;

第七步,OD值降幅:取第三步酶标仪0min和30min读取的待检的OD值,分别计算Q1、Q2、

Q3的均值,不同时间OD值的变化幅度应 $\leq 15\%$ 。

[0009] 实施例2 对比实验

为了验证本发明方法和常用检验方法之间的区别,申请人设计了以下的对比实验:

选取郑州安图生物工程股份有限公司生产的3批通用显色剂,分别使用本发明检验方法和常规采用的在乙肝表面抗体检测试剂盒(酶联免疫法)上进行检验。

[0010] 具体检验方法如下:加样布局如下表2所示:

表2

NC	NC	NC	NC
PC	PC	PC	PC
J	J	J	J
J	J	J	J
J	J	J	J
J	J	J	J
J	J	J	J
J	J	J	J
J	J	J	J
待检显色剂		对照显色剂	
NC：阴性对照 PC：阳性对照 J：精密性参考品			

按照表2的加样布局,在空白酶标板中依次加入阴性对照、阳性对照、精密性参考品J各50ul,在孵育器中37℃温育30min,立即使用洗涤液洗板6次,加入通用底物液、通用显色剂(待检和对照)各50ul后温育10min,然后加入通用终止液后使用酶标仪450/630nm双波读数。具体数据见表3所示。

[0011] 表3

	批号	标准范围	检测结果
在乙肝表面抗体检测试剂盒（酶联免疫法）上检验	20180101	OD 值：1.0±0.2	0.97
	20180102	OD 值：1.0±0.2	0.95
	20180103	OD 值：1.0±0.2	0.87
使用本发明的检验方法检验	20180101	OD 值：0.5±0.2	0.56
		OD 值：1.0±0.2	1.02
		OD 值：2.0±0.2	2.04
	20180102	OD 值：0.5±0.2	0.55
		OD 值：1.0±0.2	0.98
		OD 值：2.0±0.2	2.05
	20180103	OD 值：0.5±0.2	0.44
		OD 值：1.0±0.2	0.89
		OD 值：2.0±0.2	1.77

通过表3中的检测数据比对可以看出：

20180101批和20180102批显色剂，采用以上两种检测方法均显示符合标准；但在检验20180103批显色剂时，使用本发明的检验方法可以很好的看出该批显色剂在高值范围（2.0±0.2）不符合要求；而在乙肝表面抗体检测试剂盒（酶联免疫法）上检验时却符合要求。说明当前采用的常规检验方法存在缺陷，在低值（0.5）和高值（2.0）附近缺少质控点。

[0012] 本发明检验方法通过外观检查、空白孔观察、OD值批内范围和变异、OD值批间范围和变异、OD值降幅，对酶联免疫试验用底物液、显色剂、终止液产品进行系列化检查，检验步骤清晰明了，操作简单，检验全面，检验结果真实可靠；全面涵盖了低中高三个质控范围，适用范围广，且不用在每种试剂盒上单独检验，节约了成本。

专利名称(译)	酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法		
公开(公告)号	CN109975539A	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201910289154.X	申请日	2019-04-11
[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	韩文斌 张金蕊 刘利晶 陈静 李彬		
发明人	韩文斌 张金蕊 刘利晶 陈静 李彬		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/535		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种酶联免疫试验用底物液、显色剂和终止液的检验方法，通过外观检查、空白孔观察、OD值批内范围和变异、OD值批间范围和变异、OD值降幅，对酶联免疫底物液、显色剂、终止液产品进行一系列检查，检验步骤清晰明了，操作简单，检验全面，检验结果真实可靠，且具有广泛的通用性，可对市场上所有的底物液、显色剂和终止液进行检验，适用范围广，且不用在每种试剂盒上单独检验，大量的节约了人力物力。