



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110632293 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201910891905.5

(22)申请日 2019.09.20

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450000 河南省郑州市经开区经北一路87号

(72)发明人 王万利 王春霞 陶占领 刘功成
张跃峰 渠海 郑业焕 付光宇
吴学炜

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 刘伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种消除HRP抗体干扰的方法

(57)摘要

本发明属于体外诊断技术,公开了一种消除HRP抗体干扰的方法,在以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中添加阻断剂,所述阻断剂为脱辅基失活的HRP。脱辅基失活的HRP与HRP抗体结合能阻断血清中的HRP抗体与HRP标记抗体或HRP标记抗原的结合,从而消除HRP抗体对检测结果的干扰。本发明所述消除HRP抗体干扰的方法,解决了以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中存在的共性问题,消除HRP抗体干扰导致的假阳性,特别是消除IgM联检时出现的多项目IgM假阳性,也能改善免疫分析中由于HRP抗体干扰导致量值相关性差问题。且添加阻断剂不影响正常样本的检测结果,提升检测结果的准确性。

1. 一种消除HRP抗体干扰的方法,在以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中添加阻断剂,所述阻断剂为脱辅基失活的HRP。
2. 根据权利要求1所述的方法,所述脱辅基失活的HRP的添加浓度为0.01-0.5mg/ml。
3. 根据权利要求1所述的方法,所述脱辅基失活的HRP添加组分为样品稀释液或酶结合物中。
4. 根据权利要求1所述的方法,所述辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统包括辣根过氧化物酶标记的酶联免疫法检测系统和辣根过氧化物酶标记的化学发光法检测系统。
5. 根据权利要求4所述的方法,所述酶联免疫法或化学发光法检测系统的检测方法为捕获法测定IgM或竞争法测抗原。
6. 根据权利要求5所述的方法,所述捕获法测定IgM为酶标抗原法测定IgM或酶标记抗体加抗原法测定IgM。

一种消除HRP抗体干扰的方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术,具体是涉及一种消除HRP抗体干扰的方法,尤其是一种消除以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中HRP抗体干扰的方法。

背景技术

[0002] 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,简称HRP)是一种分子量达44000,含亚铁血红素的糖蛋白,广泛分布于植物界,尤其在辣根中含量很高,因为又称为辣根过氧化物酶。早在20世纪30年代就有人着手从辣根中分离此酶,以后又制备出结晶。通常试验中以辣根为原料,经过水的抽提,硫酸铵和丙酮分级分离,再经锌离子纯化,透析除盐,冰冻干燥,便可得到高纯度的辣根过氧化物酶。标记物是免疫酶技术中的关键试剂,由于具备易于提取、价格实惠、性质稳定等优点,HRP成为ELISA实验中应用最广泛的标记酶。

[0003] 辣根,是一种耐寒的常年生草本植物,主要分布在世界温带地区,它的根具有很好的烹饪价值。人们食用辣根的历史非常悠久,很多民族的传统菜品都出现过它的身影。早在公元1世纪左右,辣根就出现了罗马人的菜谱中,大约在13世纪辣根传入德国并渐渐成为欧洲最重要的调味香料,犹太的传统美食“犹太辣根酱”就是由辣根泥混合醋、糖和盐调配而成。辣根膏主要由辣根经粉碎成粉后加水制成,是生食海鲜、马肉必蘸的调味料,在日本广为应用。辣根早在80年前就由英国人引入上海,目前在我国上海、江苏、山东、辽宁等均有栽培,目前国内市售的山葵酱和山葵粉大多采用辣根制作的。鉴于辣根是一种食材,那么人体内可能存在针对辣根即HRP的抗体。

[0004] 捕获法测IgM时,当待测样本中含抗HRP的IgM抗体时,这些IgM抗体将被捕获到包被板或磁微粒上,其将与HRP标记的抗原或HRP标记的抗体结合,产生假阳性。竞争法测抗原时,当待测样本中含HRP抗体时,其将与HRP标记的抗原或HRP标记的抗体结合,从而干扰检测结果。

[0005] 目前优生优育TORCH IgM抗体检测项目,国内厂家基本上都采用捕获法,临幊上会遇到TORCH-IgM 5项都是阳性的情况。TORCH感染筛查是一系列病原体的感染筛查,各病原体之间没有感染的相关性,因此,一份样本同时急性感染多个病毒的现象临幊是非常罕见的,IgM多项同阳一般是假阳性的几率非常大,IgM多项同阳样本经确认后基本上也是假阳性。因此需要寻找一种消除HRP抗体干扰的方法,用于消除以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中因HRP抗体干扰造成的假阳性。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种消除HRP抗体干扰的方法,用于消除以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中因HRP抗体干扰造成的假阳性,提升检测结果的准确性。

[0007] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

[0008] 一种消除HRP抗体干扰的方法,在以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中

添加阻断剂,所述阻断剂为脱辅基失活的HRP。

[0009] 脱辅基失活的HRP是HRP去除辅基血红素的产物,其无HRP的生物学活性。本发明所述的消除HRP抗体干扰的方法在以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中添加脱辅基失活的HRP,脱辅基失活的HRP与HRP抗体结合能阻断血清中的HRP抗体与HRP标记抗体或HRP标记抗原的结合,从而消除HRP抗体对检测结果的干扰。

[0010] 作为优选,所述消除HRP抗体干扰的方法中所述脱辅基失活的HRP的添加浓度为0.01-0.5mg/ml。

[0011] 在一些实施方案中,所述消除HRP抗体干扰的方法中所述脱辅基失活的HRP的添加浓度为0.5mg/ml。

[0012] 在本发明所述的消除HRP抗体干扰的方法中,所述脱辅基失活的HRP添加组分为样品稀释液或酶结合物中。即脱辅基失活的HRP添加入以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中的样品稀释液或酶结合物中。

[0013] 本领域技术人员可以理解,所述辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统包括辣根过氧化物酶标记的酶联免疫法检测系统和辣根过氧化物酶标记的化学发光法检测系统。

[0014] 其中,所述酶联免疫法或化学发光法检测系统的检测方法包括但不限于捕获法测定IgM或竞争法测抗原。

[0015] 所述捕获法测定IgM包括但不限于酶标抗原法测定IgM或酶标记抗体加抗原法测定IgM。

[0016] 本发明公开了一种消除HRP抗体干扰的方法,在以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中添加阻断剂,所述阻断剂为脱辅基失活的HRP。脱辅基失活的HRP与HRP抗体结合能阻断血清中的HRP抗体与HRP标记抗体或HRP标记抗原的结合,从而消除HRP抗体对检测结果的干扰。本发明所述消除HRP抗体干扰的方法,涉及到捕获法测IgM抗体、竞争法测抗原等,解决了以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中存在的共性问题,消除HRP抗体干扰导致的假阳性,特别是消除IgM联检时出现的多项目IgM假阳性,也能改善免疫分析中由于HRP抗体干扰导致量值相关性差问题。且添加阻断剂不影响正常样本的检测结果,提升检测结果的准确性。

附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0018] 图1示实施例2中安图生物的未添加阻断剂的孕酮定量检测试剂盒(磁微粒化学发光法)和罗氏的孕酮检测试剂盒(电化学发光法)检测量值的相关性结果图;

[0019] 图2示实施例2中安图生物的添加阻断剂的孕酮定量检测试剂盒(磁微粒化学发光法)和罗氏的孕酮检测试剂盒(电化学发光法)检测量值的相关性结果图。

具体实施方式

[0020] 本发明公开了一种消除HRP抗体干扰的方法。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例

进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0021] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0022] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。

[0023] 实施例1.添加脱辅基HRP对TORCH-IgM检测结果的影响

[0024] 采用磁微粒TORCH-IgM(TOX/RV/CMV/HSV-1/HSV-2IgM)5项检测试剂盒(安图生物)检测25个待测样本。另外用酶结合物或样品稀释液中添加阻断剂(0.5mg/ml脱辅基失活的HRP)的磁微粒TORCH-IgM试剂盒(安图生物)同时检测上述25个待测样本,检测结果见表1。

[0025] 表1比较添加脱辅基HRP对TORCH-IgM检测结果的影响

样本	编号	项目									
		TOX-IgM		RV-IgM		CMV-IgM		HSV-1IgM		HSV-2IgM	
		未添加 阻断剂	添加阻 断剂								
[0026] TORC H-IgM 多项同 阳样本 (样本 含 HRP 抗体)	参考值	6-10AU/ml		5-8AU/ml		8-12AU/ml		6-10AU/ml		6-10AU/ml	
	TORCH-IgM-1	12.2	0.1	20.7	0.19	16.1	1.6	30.9	0.1	21.8	0.2
	TORCH-IgM-2	27.4	0.8	27.4	0.73	37.1	1.6	92.2	2.2	52.1	2.3
	TORCH-IgM-3	12.4	0.7	6.7	2.5	32.6	3.2	30.6	0.9	23.6	0.7
	TORCH-IgM-4	15.6	0.8	25.9	1.0	51.1	3.6	43.0	0.3	43.0	1.2
	TORCH-IgM-5	53.2	1.1	39.8	0.4	87.0	1.3	84.2	0.9	65.2	0.5
	TORCH-IgM-6	9.9	1.7	18.6	1.1	13.2	1.7	14.4	0.3	16.3	1.5
	TORCH-IgM-7	10.3	2.4	16.1	2.6	16.7	2.8	15.1	1.4	21.5	1.6
	TORCH-IgM-8	12.3	2.1	8.0	1.1	17.8	2.1	18.1	0.2	19.2	2.1
	TORCH-IgM-9	20.4	2.4	17.8	1.3	20.4	1.8	33.3	4.3	30.7	1.7

[0027]	TORCH-IgM-10	10.2	0.5	5.6	0.4	16.8	1.7	18.4	1.3	16.4	1.0
	TORCH-IgM-11	6.8	2.5	8.7	1.5	12.5	3.0	68.2	5.6	16.4	3.3
	TORCH-IgM-12	19.7	2.6	27.6	2.8	31.8	7.3	15.7	1.3	55.5	4.5
	TORCH-IgM-13	32.9	4.6	8.7	0.3	33.1	3.7	56.1	3.1	46.0	1.5
	TORCH-IgM-14	18.2	2.5	7.1	0.5	55.3	3.1	20.9	1.8	21.9	1.8
	TORCH-IgM-15	20.3	4.0	15.0	2.7	24.0	4.1	35.4	3.4	26.0	5.4
	YB-1	0.06	0.08	12.50	13.25	0.42	0.45	0.14	0.17	0.36	0.21
	YB-2	0.43	0.31	0.22	0.33	0.44	0.25	0.26	0.23	0.29	0.35
	YB-3	0.37	0.07	0.47	0.11	22.45	23.13	0.34	0.13	0.08	0.33
	YB-4	0.27	0.27	0.19	0.30	0.14	0.20	0.24	0.13	0.35	0.22
	YB-5	0.47	0.02	0.36	0.04	0.10	0.18	0.23	0.13	0.15	0.27
	YB-6	0.04	0.19	0.25	0.44	0.22	0.47	0.32	0.39	15.38	16.23
	YB-7	0.28	0.05	0.34	0.32	0.23	0.43	0.05	0.47	0.19	0.04
	YB-8	0.22	0.08	0.22	0.08	0.18	0.47	0.48	0.08	0.01	0.43
	YB-9	0.11	0.28	0.30	0.50	0.25	0.10	0.22	0.23	0.41	0.35
	YB-10	0.23	0.14	0.26	0.07	0.03	0.18	0.30	0.49	0.30	0.34

[0028] 结果显示,添加0.5mg/ml脱辅基失活的HRP后,TORCH-IgM多项同阳样本(样本中含HRP抗体)假阳性被消除了,而正常样本检测结果没有影响。

[0029] 实施例2.添加脱辅基HRP消除HRP抗体对竞争法的干扰

[0030] 分别利用安图生物的孕酮定量检测试剂盒(磁微粒化学发光法)和罗氏的孕酮检测试剂盒(电化学发光法)检测16个待测样本。另外用酶结合物中添加阻断剂(0.01mg/ml脱辅基HRP)的磁微粒孕酮定量检测试剂盒(安图生物)同时检测上述16个待测样本,检测结果见表2和图1-2。

[0031] 表2比较添加脱辅基HRP对竞争法检测结果的影响

孕酮项目	编号	孕酮定量检测试剂盒 (磁微粒化学发光法) (安图)检测结果		孕酮检测试剂盒 (电化学发光法) (罗氏)检测结果
		未添加阻断剂	添加阻断剂	罗氏
参考区间	0.5-120ng/ml		0.05-60ng/ml	
[0032]	0801-133	0.58	0.06	0.06
	0805-061	1.66	0.12	0.07
	0802-193	27.50	13.48	15.49
	0731-032	0.79	0.06	0.15
	0802-014	8.13	5.29	5.75
异常样本	0730-028	0.071	0.057	0.09
	0730-029	0.491	0.412	0.60

[0033]

0730-059	10.92	10.93	11.66
0730-078	23.09	22.61	22.54
0730-111	4.88	4.96	4.93
0802-17	12.34	12.51	11.97
0806-45	0.98	0.95	0.97
0807-34	7.45	7.28	7.31
0807-68	28.32	28.79	27.01
0807-98	19.25	19.14	20.16
0805-67	37.87	38.02	36.69

[0034] 结果显示,与未添加阻断剂的孕酮定量检测试剂盒(磁微粒化学发光法)检测的结果相比,添加阻断剂的孕酮定量检测试剂盒(磁微粒化学发光法)检测的量值与罗氏的孕酮检测试剂盒(电化学发光法)检测的量值的相关性更优。

[0035] 实施例3.

[0036] 1、样本中含HRP抗体的验证1

[0037] 将脱辅基失活的HRP包被酶标板,洗涤后,加入25个待测样本,经孵育洗涤后,加入酶标记抗抗体(抗人IgG抗体、抗人IgM抗体)分别采用间接法检测样本中的IgG和IgM抗体(IgM抗体检测:样本预先吸附剂羊抗人IgG处理),实验数据如下:

[0038] 表3:样本含HRP抗体验证实验1

[0039]

样本	编号	项目	
		IgM 抗体	IgG 抗体
	参考值	0.15	0.15
TORCH-IgM -1	0.422	3.071	
TORCH-IgM -2	0.311	1.123	
TORCH-IgM -3	0.713	0.652	
TORCH-IgM -4	0.458	0.448	
TORCH-IgM -5	0.519	2.576	
TORCH-IgM -6	0.219	0.372	
TORCH-IgM -7	0.365	0.364	
TORCH-IgM -8	0.412	0.316	
TORCH-IgM -9	0.483	0.884	
TORCH-IgM -10	0.389	0.631	
TORCH-IgM -11	0.425	0.936	
TORCH-IgM -12	0.833	1.473	

[0040]

正常样本

TORCH-IgM -13	0.492	0.337
TORCH-IgM -14	0.281	1.995
TORCH-IgM -15	0.225	0.439
YB-1	0.012	0.024
	0.043	0.025
	0.002	0.057
	0.051	0.022
	0.036	0.035
	0.042	0.033
	0.023	0.065
	0.036	0.013
	0.033	0.051
	0.065	0.020

[0041] 结果显示:正常样本中无针对失活HRP的抗体,TORCH-IgM多项同阳样本含针对失活HRP的抗体。

[0042] 2、样本中含HRP抗体的验证2

[0043] 利用磁微粒CMV-IgM抗体检测试剂盒检测20个待测样本,在酶结合物稀释液中添加0.01mg/ml HRP(有生物学活性)替换磁微粒CMV-IgM抗体检测试剂盒酶结合物组分同时检测上述20个待测样本,实验数据如下:

[0044] 表4:样本含HRP抗体检验证实验2

[0045]

样本	磁微粒 CMV-IgM 项目	
	酶结合物稀释液 +CMV-IgM 酶标抗原	酶结合物稀释液 +0.01mg/ml HRP
参考值	8-12AU/ml	
正常样本	P1	42.79
	P2	312.62
	P3	63.86
	P4	144.41
	P5	76.72
异常样本 (含 HRP 抗体样本)	TORCH-IgM-1	16.19
	TORCH-IgM-2	37.19
	TORCH-IgM-3	32.62
	TORCH-IgM-4	51.12
	TORCH-IgM-5	87.03
	TORCH-IgM-6	13.23

[0046]

TORCH-IgM-7	16.74	9.41
TORCH-IgM-8	17.82	12.19
TORCH-IgM-9	20.43	13.43
TORCH-IgM-10	16.84	13.25
TORCH-IgM-11	12.51	5.99
TORCH-IgM-12	31.82	21.90
TORCH-IgM-13	33.14	21.45
TORCH-IgM-14	55.36	37.06
TORCH-IgM-15	24.78	17.03

[0047] 结果显示,5份正常样本与HRP无反应性,而15份异常样本与HRP有反应,证明这些样本里含HRP抗体。

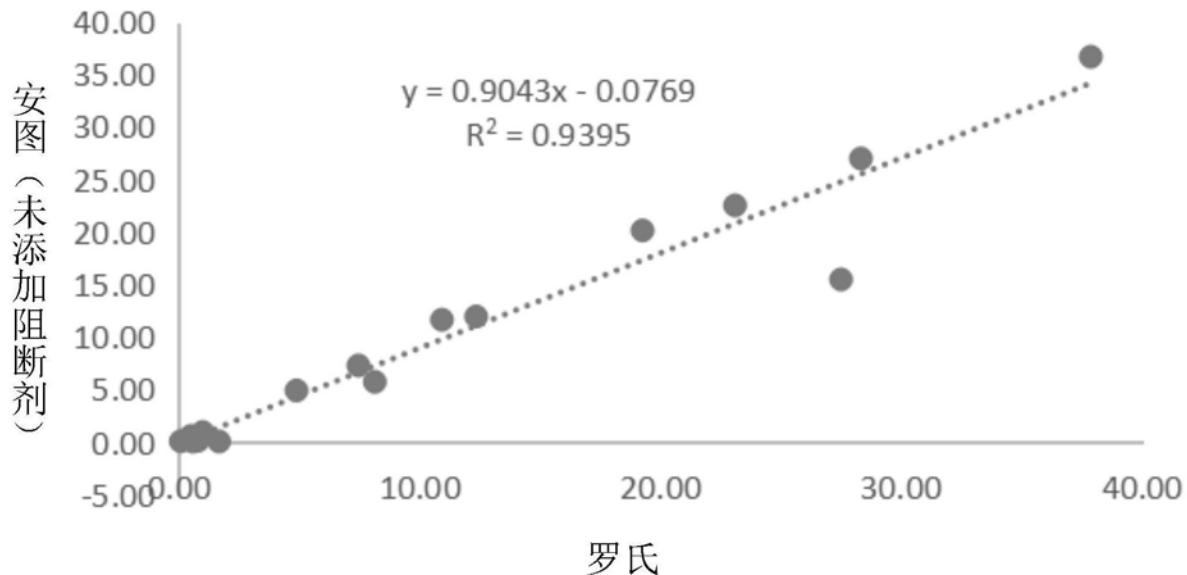


图1

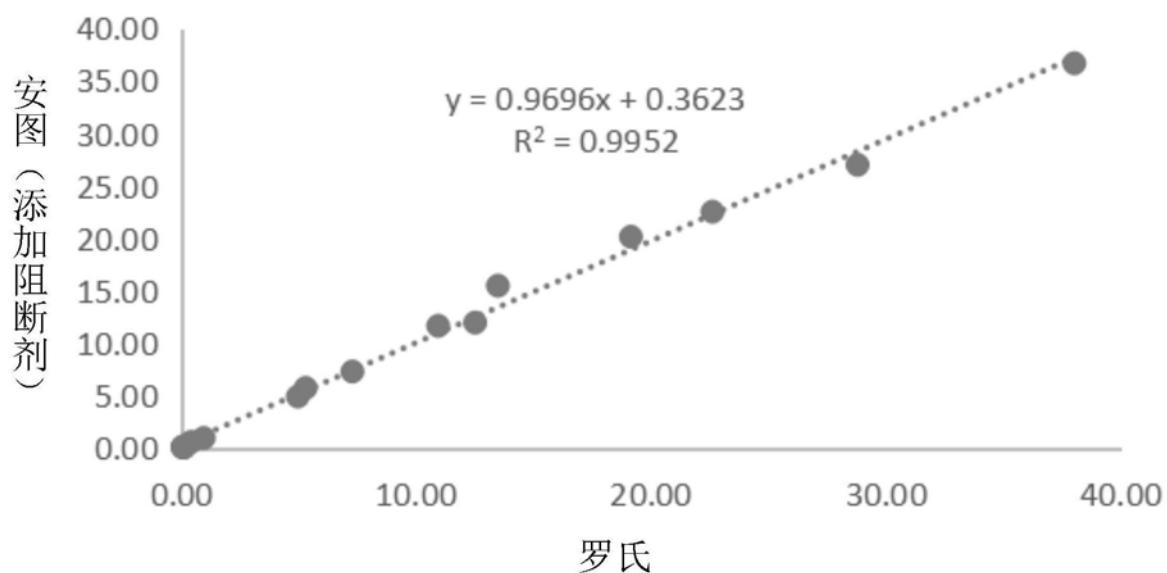


图2

专利名称(译)	一种消除HRP抗体干扰的方法		
公开(公告)号	CN110632293A	公开(公告)日	2019-12-31
申请号	CN201910891905.5	申请日	2019-09-20
[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	王万利 王春霞 陶占领 刘功成 张跃峰 渠海 郑业煥 付光宇 吴学炜		
发明人	王万利 王春霞 陶占领 刘功成 张跃峰 渠海 郑业煥 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/64		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/64		
代理人(译)	刘伟		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于体外诊断技术，公开了一种消除HRP抗体干扰的方法，在以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中添加阻断剂，所述阻断剂为脱辅基失活的HRP。脱辅基失活的HRP与HRP抗体结合能阻断血清中的HRP抗体与HRP标记抗体或HRP标记抗原的结合，从而消除HRP抗体对检测结果的干扰。本发明所述消除HRP抗体干扰的方法，解决了以辣根过氧化物酶为标记物的免疫检测系统中存在的共性问题，消除HRP抗体干扰导致的假阳性，特别是消除IgM联检时出现的多项IgM假阳性，也能改善免疫分析中由于HRP抗体干扰导致量值相关性差问题。且添加阻断剂不影响正常样本的检测结果，提升检测结果的准确性。

样本	编号	项目								
		TOX-IgM		RV-IgM		CMV-IgM		HSV-IgM		
		未添加阻断剂	添加阻断剂	未添加阻断剂	添加阻断剂	未添加阻断剂	添加阻断剂	未添加阻断剂	添加阻断剂	
TORCH-IgM-1 多项同阳样本 (样本含HRP抗体)	参考值	6-10AU/ml		5-8AU/ml		8-12AU/ml		6-10AU/ml		6-10AU/ml
TORCH-IgM-1	12.2	0.1	20.7	0.19	16.1	1.6	30.9	0.1	21.8	0.2
TORCH-IgM-2	27.4	0.8	27.4	0.73	37.1	1.6	92.2	2.2	52.1	2.3
TORCH-IgM-3	12.4	0.7	6.7	2.5	32.6	3.2	30.6	0.9	23.6	0.7
TORCH-IgM-4	15.6	0.8	25.9	1.0	51.1	3.6	43.0	0.3	43.0	1.2
TORCH-IgM-5	53.2	1.1	39.8	0.4	87.0	1.3	84.2	0.9	65.2	0.5
TORCH-IgM-6	9.9	1.7	18.6	1.1	13.2	1.7	14.4	0.3	16.3	1.5
TORCH-IgM-7	10.3	2.4	16.1	2.6	16.7	2.8	15.1	1.4	21.5	1.6
TORCH-IgM-8	12.3	2.1	8.0	1.1	17.8	2.1	18.1	0.2	19.2	2.1
TORCH-IgM-9	20.4	2.4	17.8	1.3	20.4	1.8	33.3	4.3	30.7	1.7