



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102507918 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201110352236. 8

(22) 申请日 2011. 11. 09

(73) 专利权人 四川新健康成生物股份有限公司
地址 610000 四川省成都市高新区天辰路
88 号

(72) 发明人 周方银 韩帅 谭韬 周帅
何涛涛

(74) 专利代理机构 成都行之专利代理事务所
(普通合伙) 51220

代理人 梁田

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/82 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102007413 A, 2011. 04. 06,
US 2003/0003503 A1, 2003. 01. 02,
CN 101432626 A, 2009. 05. 13,

审查员 段晓露

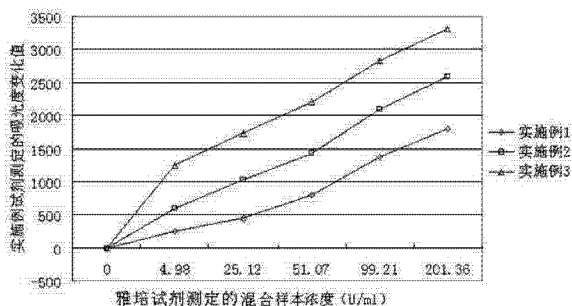
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒

(57) 摘要

本发明公开抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,包括 R1 试剂和 R2 试剂,所述 R1 试剂中的组分包括:缓冲液、无机盐、表面活性剂、防腐剂、干扰清除蛋白、(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球和超纯水;所述 R2 试剂中的组分包括:缓冲液、无机盐、表面活性剂、防腐剂、抗 Anti-CCP 的第二抗体和超纯水;并且,所述 R1 试剂和 R2 试剂的配合比例按重量百分数计为 50~90:10~50。本发明利用胶乳增强免疫透射比浊法并且加入抗 Anti-CCP 的第二抗体测定 Anti-CCP,对检测信号进行两级放大,提高了检测灵敏度,扩大了测定范围;并且可以应用于全自动生化分析仪缩短检测时间,提高了检测效率。



1. 抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,其特征在于,包括 R1 试剂和 R2 试剂,以重量百分比计,

所述 R1 试剂中的组分包括:

缓冲液 0.4%~10%、

无机盐 1%~10%、

表面活性剂 0.05%~2%、

防腐剂 0.02%~0.2%、

干扰清除蛋白 0.02%~0.2%、

CCP 致敏的纳米 PS 微球 0.01%~0.2%、

超纯水 77.4%~98.5% ;

所述 R2 试剂中的组分包括:

缓冲液 0.4%~10%、

无机盐 1%~10%、

表面活性剂 0.05%~2%、

防腐剂 0.02%~0.2%、

抗 Anti-CCP 的第二抗体 0.001%~0.5%、

超纯水 77.3%~98.529% ;

并且,所述 R1 试剂和 R2 试剂的配合比例按重量百分数计为 50 ~ 90:10 ~ 50。

2. 如权利要求 1 所述的抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,其特征在于,所述 CCP 致敏的纳米 PS 微球的直径为 60 ~ 500nm。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,其特征在于,所述抗 Anti-CCP 的第二抗体为非人源抗体或非人源抗体 Fab 双体片段。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为 PB 缓冲液或 Goods' 缓冲液。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂为 TWEEN 20、EMULGEN120 和 TX100 中的一种。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,其特征在于,所述防腐剂为 ProClin300、叠氮钠和硫柳汞中的一种。

抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫体外诊断领域,涉及一种免疫比浊检测试剂,进一步地,本发明涉及抗环瓜氨酸肽抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 抗环瓜氨酸肽抗体 (Anti-CCP) 是环状聚丝蛋白的多肽片段,是以 IgG 型为主的抗体。临床研究表明, Anti-CCP 对类风湿性关节炎 (RA) 具有良好的敏感性和特异性,并且与 RA 的活动性及病程进展相关,检测 Anti-CCP 对于 RA 的早期诊断和预后评估都很有意义。

[0003] 目前,临床检测 Anti-CCP 有两种方法:1. 酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay, ELISA); 2. 电化学发光免疫测定法 (Electrochemiluminescence immunoassay, ECLI)。这两种检测方法需要固相或电极支持,都需要特定的检测仪器,并且不能直接上全自动生化分析仪检测。

[0004] 另外,酶联免疫吸附测定法对样品的单批次测定费用较高。因此,为节约经济成本,检测人员操作时,通常都需要收集到大量样品后才进行一次批量试验。

[0005] 全自动生化分析仪操作方便快捷、准确度高,作为一种生物检测仪器,已经被广泛应用于生物医药行业。因此,需要研发出一种可以直接应用到全自动生化分析上的 Anti-CCP 测定试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,该试剂盒基于胶乳增强免疫透射比浊法 (PETIA),可普遍用于各类全自动生化分析仪分析,使用时所需的测定时间短,特异性好,精密度高,准确度高。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是:抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,包括 R1 试剂和 R2 试剂,

[0008] 所述 R1 试剂中的组分包括:

[0009] 缓冲液 0.4%~10%、

[0010] 无机盐 1%~10%、

[0011] 表面活性剂 0.05%~2%、

[0012] 防腐剂 0.02%~0.2%、

[0013] 干扰清除蛋白 0.02%~0.2%、

[0014] (修饰的) CCP 致敏的纳米 PS 微球 0.01%~0.2%、

[0015] 超纯水 77.4%~98.5% ;

[0016] 所述 R2 试剂中的组分包括:

[0017] 缓冲液 0.4%~10%、

[0018] 无机盐 1%~10%、

[0019] 表面活性剂 0.05%~2%、

[0020] 防腐剂 0.02%~0.2%、

[0021] 抗 Anti-CCP 的第二抗体 0.001%~0.5%、

[0022] 超纯水 77.3%~98.529%；

[0023] 并且,所述 R1 试剂和 R2 试剂的配合比例按重量百分数计为 50 ~ 90:10 ~ 50。

[0024] 上述技术方案中,CCP 为环瓜氨酸肽的简称,本文其余部分所指相同。PS 为聚苯乙烯的简称,即本发明选用聚苯乙烯制备胶乳颗粒,本文其余部分所指相同。所述无机盐是 KCl、NaCl、KOH 的混合物。

[0025] 进一步的,所述(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球的直径为 60 ~ 500nm。

[0026] 进一步的,所述抗 Anti-CCP 的第二抗体为非人源抗体或非人源抗体 Fab 双体片段。具体的,所述抗 Anti-CCP 的第二抗体可以是兔抗人抗体,鸡抗人抗体,鸭抗人抗体,鹅抗人抗体,羊抗人抗体,鼠抗人抗体,马抗人抗体,Fab 双体中的一种。

[0027] 进一步的,所述缓冲液为 PB 缓冲液或 Goods' 缓冲液。

[0028] 进一步的,所述表面活性剂为 TWEEN 20、EMULGEN120 和 TX100 中的一种。

[0029] 进一步的,所述防腐剂为 ProClin300、叠氮钠和硫柳汞中的一种。

[0030] 上述技术方案的技术原理是基于改进的胶乳增强免疫透射比浊法。如果 R2 试剂中没有抗 Anti-CCP 的第二抗体,那么在 Anti-CCP 的含量极少或是极高时,形成的沉淀物 Anti-CCP-(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球复合物(即抗体-抗原-PS 颗粒复合物)很少,甚至无沉淀物形成,检测试剂将不能准确检测 Anti-CCP 的含量。因此,本发明技术方案在 R2 试剂中加入抗 Anti-CCP 的第二抗体,抗 Anti-CCP 的第二抗体结合在抗体-抗原-PS 颗粒复合物中 Anti-CCP 的 Fc 端,发生抗原抗体特异性反应,形成了第二抗体-抗体-抗原-PS 颗粒复合物,进一步增强了反应吸光度,放大了检测信号,可极大的提高检测 Anti-CCP 的灵敏度、扩大测定范围、缩短检测时间。

[0031] 所以,R2 试剂中加入抗 Anti-CCP 的第二抗体的优点在于“提高检测灵敏度,扩大测定范围,缩短检测时间”。在类风湿关节炎早期,血液中的 Anti-CCP 含量极少,利用普通胶乳增强免疫透射比浊法有时也难以区分正常人群与早期类风湿关节炎患者。加入第二抗体的检测试剂盒,可以准确检测出 Anti-CCP 的含量。

[0032] 综上所述,本发明与现有技术相比,具有如下优点:

[0033] (1)、本发明试剂盒利用胶乳增强免疫透射比浊法测定 Anti-CCP,放大检测信号,提高检测灵敏度,缩短检测时间。

[0034] (2)、在 R2 试剂中加入抗 Anti-CCP 的第二抗体,进一步增强了反应吸光度,放大了检测信号,极大的提高检测 Anti-CCP 的灵敏度;本发明试剂盒用于 Anti-CCP 的测定范围为 2 ~ 200U/ml。

[0035] (3)、本发明试剂盒为均匀液相,可以应用到目前存在市场上的所有类型的全自动生化分析仪,使 Anti-CCP 的测定更为方便和快捷,提高了实验效率。

[0036] (4)、使用全自动生化分析仪测定抗环瓜氨酸肽抗体,不仅使操作更为简便,提高自动化程度,而且还节约了少量样品检测实验的经济成本。全自动生化分析仪在多批次对少量样品进行检测,和单批次对大量样品检测的成本几乎相同;因此,全自动生化分析仪可以适用于对少量样品的检测,并且不提高经济成本。

附图说明

[0037] 附图 1 为实施例 1、实施例 2 和实施例 3 中雅培试剂测定的混合样本浓度(U/ml)与吸光光度值的关系变化图。

[0038] 附图 2 为对比例 1、对比例 2 和对比例 3 中雅培试剂测定的混合样本浓度(U/ml)与吸光光度值的关系变化图。

具体实施方式

[0039] 下面结合实施例及附图,对本发明作进一步的详细说明,但本发明的实施方式不限于此。

[0040] 实施例 1

[0041] 抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,包括 R1 试剂和 R2 试剂,

[0042] 所述 R1 试剂中的组分成分(按重量百分数)是:

[0043]

PB 缓冲液	0.4%
无机盐	1%
TWEEN20	0.05%
ProClin300	0.02%
干扰清除蛋白(Roche)	0.02%
(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球	0.1%
超纯水	98.41%

[0044] 上述成分混合,即得试剂 1;其中,所述(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球可以根据现有技术采用化学交联法制备,其直径为 60nm。

[0045] 所述 R2 试剂中的组分成分(按重量百分数)是:

[0046]

PB 缓冲液	0.4%
无机盐	1%
TWEEN20	0.05%
ProClin300	0.02%
羊抗人 IgG-FC 抗体	0.001%
超纯水	98.529%

[0047] 上述成分混合,即得试剂 2。

[0048] 使用时,R1 试剂和 R2 试剂的配合比例按重量百分数计为 1:1。

[0049] 所述羊抗人 IgG-FC 抗体是抗 Anti-CCP 第二抗体的一种,在具体实施时,也可以用兔抗人抗体,鸡抗人抗体,鸭抗人抗体,鹅抗人抗体,鼠抗人抗体,马抗人抗体等其他非人源抗体或非人源抗体 Fab 双体片段来代替。

[0050] 实施例 2

[0051] 抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,包括 R1 试剂和 R2 试剂,

[0052] 所述 R1 试剂中的组分成分(按重量百分数)是:

[0053]

PB 缓冲液	5%
无机盐	5%
Emulgen120	1%
叠氮钠	0.1%
干扰清除蛋白(scantibodies)	0.1%
(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球	0.06%
超纯水	88.74%

[0054] 上述成分混合,即得试剂 1;其中,所述(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球可以根据现有技术采用化学交联法制备,其直径为 200nm。

[0055] 所述 R2 试剂中的组分成分(按重量百分数)是:

[0056]

PB 缓冲液	5%
无机盐	5%
EMULGEN120	1%
叠氮钠	0.1%
羊抗人 IgG-FC 抗体	0.3%
超纯水	88.6%

[0057] 上述成分混合,即得试剂 2。

[0058] 使用时,R1 试剂和 R2 试剂的配合比例按重量百分数计为 5:1。

[0059] 实施例 3

[0060] 抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒,包括 R1 试剂和 R2 试剂,

[0061] 所述 R1 试剂中的组分成分(按重量百分数)是:

[0062]

Goods' 缓冲液	10%
无机盐	10%
TX100	2%
硫柳汞	0.2%
干扰清除蛋白(Roche)	0.2%
(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球	0.05%
超纯水	77.55%

[0063] 上述成分混合,即得试剂 1;其中,所述(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球可以根据现有技术采用化学交联法制备,其直径为 500nm。

[0064] 所述 R2 试剂中的组分成分(按重量百分数)是:

[0065]

PB 缓冲液	10%
无机盐	10%
TX100	2%
硫柳汞	0.2%
羊抗人 IgG-FC 抗体	0.5%
超纯水	77.3%

[0066] 上述成分混合,即得试剂 2。

[0067] 使用时,R1 试剂和 R2 试剂的配合比例按重量百分数计为 9:1。

[0068] 本实施例检测范围为:2 ~ 200u/ml。

[0069] 将由上述实施例 1- 实施例 3 所制备得到的试剂盒,用于测定一系列 Anti-CCP 浓度已知的混合样本的吸光度变化值(用 ΔA 表示)。混合样本的 Anti-CCP 浓度由雅培试剂测定得到。测定结果见下表:

[0070]

雅培试剂测定的混合样本浓度(U/ml)	实施例 1 (ΔA)	实施例 2 (ΔA)	实施例 3 (ΔA)
0	0.0005	-0.0011	0.0021
4.98	245	599	1257
25.12	449	1026	1729
51.07	801	1437	2219
99.21	1382	2103	2831
201.36	1803	2592	3314

[0071] 如附图 1 所示,为根据上表绘制的雅培试剂测定的混合样本浓度(U/ml)与各实施例试剂测定的吸光度变化值的关系图。

[0072] 对比例

[0073] 按照下列配方制备不添加第二抗体的 Anti-CCP 测定试剂盒

[0074]

R1 试剂	对比例 1	对比例 2	对比例 3
Buffer	0.4% (PB)	5% (PB)	10% (Goods')
无机盐	1%	5%	10%
表面活性剂	0.05% (TWEEN20)	1% (EMULGEN120)	2% (TX100)
防腐剂	0.02% (ProClin300)	0.1% (叠氮钠)	0.2% (硫柳汞)
干扰清除蛋白	0.02% (Roche)	0.1% (scantibodies)	0.2% (Roche)
超纯水	98.51%	88.80%	77.60%
R2 试剂	对比例 1	对比例 2	对比例 3
Buffer	0.4% (PB)	5% (PB)	10% (Goods')
无机盐	1%	5%	10%
(修饰的)CCP 致敏的纳米 PS 微球	0.1% (Φ 60nm)	0.3% (Φ 200nm)	0.5% (Φ 500nm)
表面活性剂	0.05% (TWEEN20)	1% (EMULGEN120)	2% (TX100)
防腐剂	0.02% (ProClin300)	0.1% (叠氮钠)	0.2% (硫柳汞)
超纯水	98.43%	88.6%	77.3%
R1 :R2(配合比例按重量百分数计)	1:1	5:1	9:1

[0075] 将由上述对比例 1-对比例 3 所制备得到的试剂盒,用于测定一系列 Anti-CCP 浓度已知的混合样本的吸光度变化值(用 ΔA 表示)。混合样本的 Anti-CCP 浓度由雅培试剂测定得到。测定结果见下表:

[0076]

雅培试剂测定的混合样本浓度(U/ml)	对比例 1 (ΔA)	对比例 2 (ΔA)	对比例 3 (ΔA)
0	-0.0007	0.0005	0.0019
4.98	29	68	175
25.12	63	134	417
51.07	188	417	891
99.21	446	719	1790
201.36	838	1423	3124

[0077] 如附图 2 所示,为根据上表绘制的雅培试剂测定的混合样本浓度(U/ml)与各对比例制备的试剂盒测定的吸光度变化值的关系图。

[0078] 如附图 1 和附图 2 所示,在 Anti-CCP 为 0-200U/ml 的范围内,添加第二抗体的实施例 1-实施例 3 相对于没有添加第二抗体的对比例 1-对比例 3 而言,其灵敏度更高,检测范围更广。

[0079] 如上所述,便可较好地实现本发明。

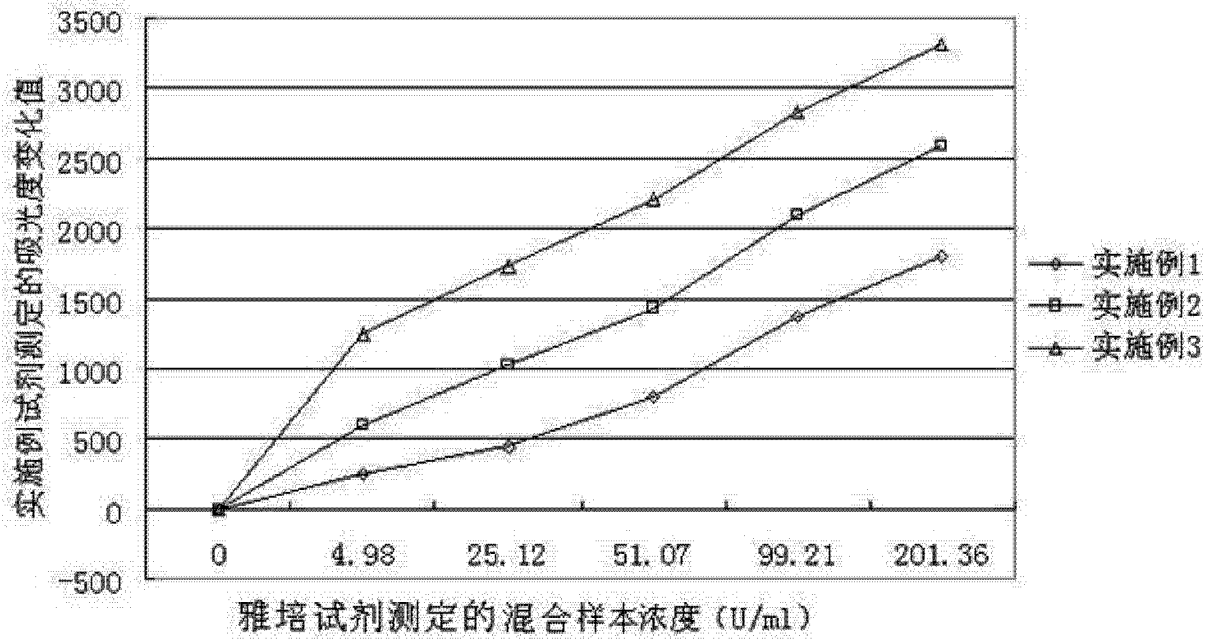


图 1

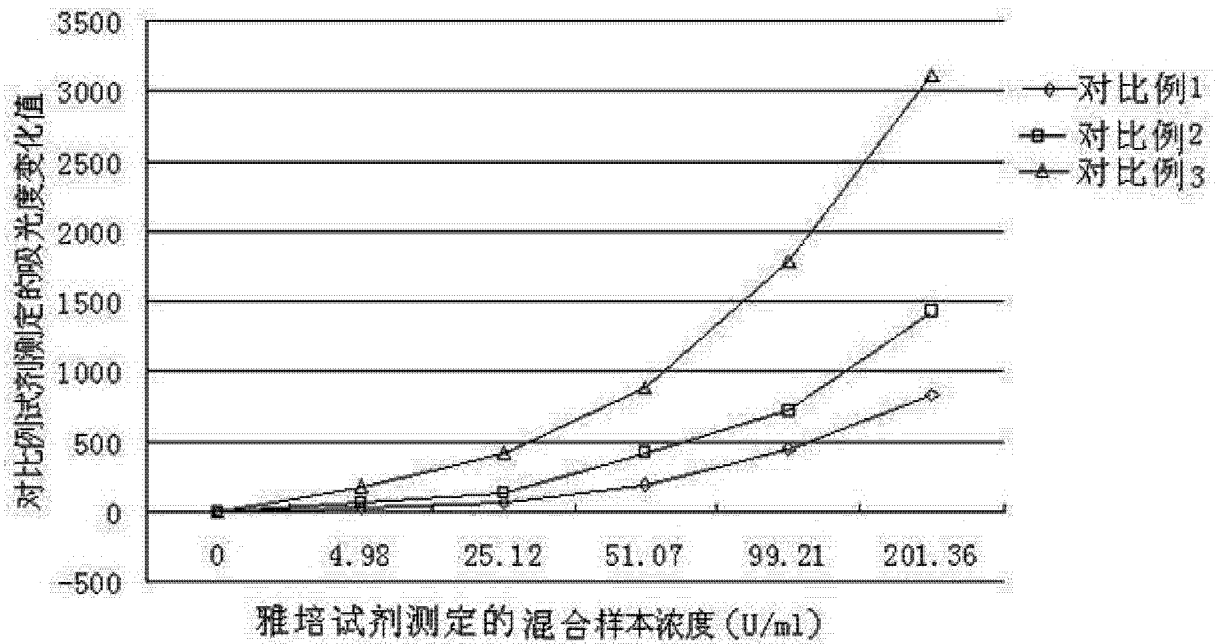


图 2

专利名称(译)	抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒		
公开(公告)号	CN102507918B	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN201110352236.8	申请日	2011-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	四川省新成生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	四川省新成生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	四川新健康成生物股份有限公司		
[标]发明人	周方银 韩帅 谭韬 周帅 何涛涛		
发明人	周方银 韩帅 谭韬 周帅 何涛涛		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/82 G01N21/31		
代理人(译)	梁田		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN102507918A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒，包括R1试剂和R2试剂，所述R1试剂中的组分包括：缓冲液、无机盐、表面活性剂、防腐剂、干扰清除蛋白、(修饰的)CCP致敏的纳米PS微球和超纯水；所述R2试剂中的组分包括：缓冲液、无机盐、表面活性剂、防腐剂、抗Anti-CCP的第二抗体和超纯水；并且，所述R1试剂和R2试剂的配合比例按重量百分数计为50~90:10~50。本发明利用胶乳增强免疫透射比浊法并且加入抗Anti-CCP的第二抗体测定Anti-CCP，对检测信号进行两级放大，提高了检测灵敏度，扩大了测定范围；并且可以应用于全自动生化分析仪缩短检测时间，提高了检测效率。

