



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109254145 A

(43)申请公布日 2019.01.22

(21)申请号 201811325407.6

(22)申请日 2018.11.08

(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 宋书杰 高远鹰 佟欢 任永茂
靳增明 付光宇 吴学炜

(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 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

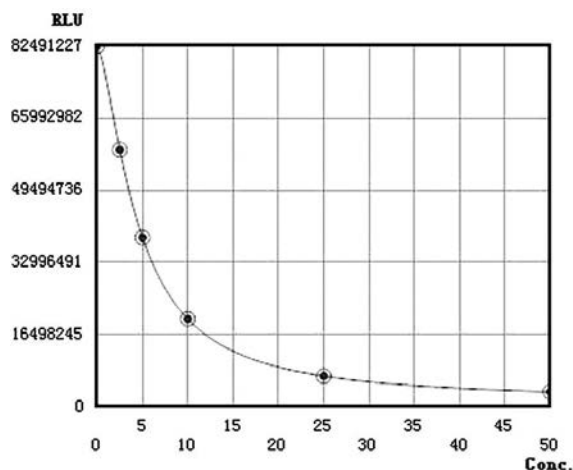
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液

(57)摘要

本发明公开了一种用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,包括0.05M Tris-NaCl缓冲液,所述0.05M Tris-NaCl缓冲液中,按照重量体积比,含有0.05%-0.3%的肝素钠,1%-20%的海藻糖和1-10%的牛免疫球蛋白G。与现有技术相比,本发明提供了一种易于实施并且可以用于改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,检测时可与其他试剂组分同时加入,便于进行自动化操作,同时该稀释液配方中各成分对环境和生物体危害较小。使用时,可作为标记抗体或抗原的稀释液、也可作为偶联包被抗原或抗体磁性小球的保存液加入反应体系中。



1. 一种用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,其特征在于:包括0.05M Tris-NaCl缓冲液,所述0.05M Tris-NaCl缓冲液中含有0.05%-0.3%的肝素钠,1%-20%的海藻糖和1-10%的牛免疫球蛋白G。

2. 根据权利要求1所述的用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,其特征在于:所述稀释液的pH值为7.0。

3. 根据权利要求1所述的用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,其特征在于:所述0.05M Tris-NaCl缓冲液中含有0.15%的肝素钠,10%的海藻糖,3%的牛免疫球蛋白G。

用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术,尤其是涉及一种用于改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液。

背景技术

[0002] 国际标准化组织对基质效应的定义是:样本中除分析物以外其他组份对检测结果的影响。临床实验室中的基质效应是指不同于新鲜血清的基质,其组分对系统测定结果引起的偏差。临床实验室经常采用新鲜血清去评估病人的生理状态或血清指标。但临床实验室常用第三方质控(伯乐质控、朗道质控等)来评估实验室的质量控制。

[0003] 第三方质控和医学上的血清样本的基质有着很大的不同。质控血清一般是采用经过处理过的混合血清、血浆或类似物(模拟人血清、血浆成分),处理方式一般包含过滤、透析、冷冻、冻干、添加稳定剂等。这些处理会引起检测系统对其反应与新鲜血清、血浆样本反应性不一致,甚至引起很大的测定差异。

[0004] 近几年,不少学者在消除基质效应的方面进行了广泛的研究,应用较多的是基质稀释和采用一些特定的装置。但是,基质稀释一般操作复杂,费时费力。而降低基质效应的装置只能应用于特定的检测系统之中,不具有通用性。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液。

[0006] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,包括0.05M Tris-NaCl缓冲液,所述0.05M Tris-NaCl缓冲液中,按照重量体积比,含有0.05%-0.3%的肝素钠,1%-20%的海藻糖和1-10%的牛免疫球蛋白G。

[0007] 所述稀释液的pH值采用浓盐酸调整至7.0。

[0008] 按照重量体积比,在0.05M Tris-NaCl缓冲液中含有0.15%的肝素钠,10%的海藻糖,3%的牛免疫球蛋白G时效果较好。

[0009] 本发明稀释液制备时,首先称取肝素钠,然后将其溶解于少量的0.05M Tris-NaCl缓冲液中,再加入海藻糖和牛免疫球蛋白G,用Tris-NaCl缓冲液定容,最后用浓盐酸调整pH值至7.0即可。

[0010] 本发明制备的稀释液检测时可作为标记抗体或抗原的稀释液,也可作为偶联包被抗原或抗体磁性小球的保存液加入反应体系;或作为一个单独的稀释液加入反应体系中。

[0011] 与现有技术相比,本发明提供了一种易于实施并且可以用于改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液,检测时可与其他试剂组分同时加入,便于进行自动化操作,同时该稀释液配方中各成分对环境和生物体危害较小。使用时,可作为标记抗体或抗原的稀释液、也可作为偶联包被抗原或抗体磁性小球的保存液加入反应体系中。

[0012] 本发明的主要创新之处在于:a) 首次将肝素钠应用于免疫检测反应过程,能显著的改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应,当免疫检测系统同时测定质控、不同类型的血清或血浆时,可减弱不同基质来源的样本对免疫试剂的干扰,以保障试剂的稳定性、重现性和可靠性;b) 稀释液中的所有组分均是该体系下的最优配方,能很好改善质控和新鲜血清的基质效应;c) 将本发明制备的以肝素钠为主要成分的稀释液用于血清样品中游离三碘甲状腺原氨酸的检测,测定新鲜血清和第三方质控(伯乐质控、朗道质控等),最终检测结果与进口对比试剂盒的检测结果相比,有较好的一致性。

附图说明

[0013] 图1是将本发明制备等稀释液应用于游离三碘甲状腺原氨酸检测校准品反应曲线。

[0014] 图2为本发明制备的稀释液应用于游离三碘甲状腺原氨酸检测新鲜血清和第三方质控,与进口对比试剂盒检测结果对比。

具体实施方式

[0015] 下面通过具体实施例对本发明做更加详细的说明,以利于本领域技术人员的理解。

[0016] 实施例1 配制用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液

本发明稀释液是在0.05M Tris-NaCl缓冲液中按重量体积比,添加0.15%肝素钠、10%海藻糖和3%牛免疫球蛋白G,然后用浓盐酸调整至pH7.0即可。

[0017] 本发明稀释液制备时,首先称取肝素钠,然后将其溶解于少量的0.05M Tris-NaCl缓冲液中,再加入海藻糖和牛免疫球蛋白G,用Tris-NaCl缓冲液定容,最后用浓盐酸调整pH值至7.0,得到缓冲液成品。

[0018] 实施例2 本发明配制的稀释液用于游离三碘甲状腺原氨酸检测新鲜血清和第三方质控

第一步,游离三碘甲状腺原氨酸检测相关试剂准备

a) 包被有抗游离三碘甲状腺原氨酸抗体的磁微粒混悬液的制备:根据使用量取适量的羧基磁微粒,用过量的EDC 和NHS 在酸性条件下(pH4.5-pH5.5)进行活化,活化缓冲液为0.05M-0.1M 的MES (2-(N- 吗啉代) 乙磺酸) 缓冲液,活化时间为30min,活化完成后,加磁场,静置5min使磁微粒与液体分开,弃去上清,用pH 为7.6的0.01M的PBS缓冲液洗涤两遍以洗去多余的活化剂;加入适量的游离三碘甲状腺原氨酸抗体,使其浓度为 2.5 μ g/mg,在0.05M-0.1M 的MES 缓冲液中(pH4.5-pH5.5)震荡反应1h;反应结束后加磁场,静置5min使磁微粒与液体分开,弃去上清,用含有1% 牛免疫球蛋白G的0.01M 的PBS 缓冲液(pH7.6)进行封闭,反复封闭5次,每次10min;封闭结束后,加入适量的封闭液以保存磁微粒,使磁微粒的最终浓度为0.5mg/ml;将该磁微粒混悬液置于2-8 $^{\circ}$ C保存,以备使用;

b) 游离三碘甲状腺原氨酸系列校准品的制备:用含有1%-3% BSA 和0.1-0.3% PC300 的Tris-NaCl缓冲液将游离三碘甲状腺原氨酸纯品配制标示浓度为0 pmol/L、2 pmol/L、5 pmol/L、10 pmol/L、25 pmol/L、50 pmol/L 的一系列校准品,瓶盖颜色依次为白、黄、绿、蓝、红、紫、黑;

c) 辣根过氧化物酶标记的游离三碘甲状腺原氨酸的制备:将游离三碘甲状腺原氨酸上的羧基与辣根过氧化物酶(HRP)分子的氨基经EDC的作用缩合为酰胺化合物,透析后即得酶标游离三碘甲状腺原氨酸;在标记好的溶液中,等比加入甘油-20℃保存备用;

d) 改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液的配制:称取肝素钠,然后将其溶解于少量0.05M Tris-NaCl缓冲液中,再加入一定比例的海藻糖和牛免疫球蛋白G,加入0.05M Tris-NaCl缓冲液定容,用浓盐酸调整pH值至7.0;

e) 向稀释液中添加1/20000-1/50000的酶标游离三碘甲状腺原氨酸抗原,即为游离三碘甲状腺原氨酸检测试剂盒的酶结合物;

f) 发光底物A液、发光底物B液及浓缩洗液的配制:发光底物A液由0.2M Tris-HCl、0.15mM Luminol、0.59mM 羟基香豆素、0.35mM 没食子酸配制而成;发光底物B液由0.85mM 氨基酸氧化酶、0.8% Tween 20、0.5mM DTPA、0.12mM 维生素C 配制而成;浓缩洗液由NaH₂PO₄·2H₂O 4.06g, Na₂HPO₄·12H₂O 62.32g, Tween 20 2-10ml, 蒸馏水 1000ml 配制而成。

[0019] 第二步,人血清样品中游离三碘甲状腺原氨酸检测的应用

a) 取出一定量的反应容器编号。根据实验要求加入50μl 校准/质控品/临床血清;

b) 摇匀磁微粒混悬液,每孔分别加入20μl;

c) 每孔分别加入酶标记物50μl;

d) 将反应容器内溶液混合均匀,37℃温育30 分钟;

e) 使用磁分离及洗涤设备,将反应容器中磁微粒用洗液洗涤5 次;

f) 将洗涤后的反应容器充分振荡使磁微粒散开;

g) 每孔加入发光底物A 和发光底物B 各50μl,振荡混匀后避光室温反应5 分钟;

h) 化学发光检测仪检测发光强度;

i) 采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X 轴,以校准品发光强度对数值为Y轴,建立定标曲线。根据待测样本的发光强度值回算相应的浓度值。

[0020] 采用上述方法,进行了校准品检测,标准曲线线性R大于0.999(如附图1所示)。

[0021] 实施例3 对比实验

取50份临床血清样本和伯乐质控、朗道质控,按照实施例2的检测人血清样品中游离三碘甲状腺原氨酸含量的方法步骤进行检测,同时采用进口厂家的游离三碘甲状腺原氨酸检测试剂盒进行检测。结果显示:应用本发明配制的稀释液和方法进行检测,其检测结果(y)与进口厂家游离三碘甲状腺原氨酸试剂盒检测结果(x)的线性回归方程为 $y = 1.0255x - 0.3731$,相关系数可达到 $R^2 = 0.9936$ (如附图2所示)。

[0022] 测定第三方质控和新鲜血清,每天测单孔,连续测定20d,求进口厂家、新构建试剂盒测定游离三碘甲状腺原氨酸均值,结果如下表所示。

类型↵	批号↵	进口对比厂家↵	新构建试剂盒↵	比值↵
伯乐质控↵	40341↵	4.31↵	4.17↵	0.97↵
	40342↵	11.12↵	10.79↵	0.96↵
	40343↵	21.87↵	20.13↵	0.92↵
朗道质控↵	1619EC↵	6.03↵	6.12↵	1.01↵
	1662EC↵	15.40↵	14.77↵	0.96↵
	1647EC↵	30.11↵	29.19↵	0.97↵
真实血清↵	p15↵	4.23↵	4.17↵	0.99↵
	p45↵	11.97↵	11.24↵	0.94↵
	p47↵	21.13↵	19.97↵	0.94↵
	p50↵	31.26↵	32.48↵	1.04↵

[0023] 从表中可以看出,新构建游离三碘甲状腺原氨酸试剂盒测定结果与进口对比厂家测定结果偏差在10%以内,有较好的一致性。

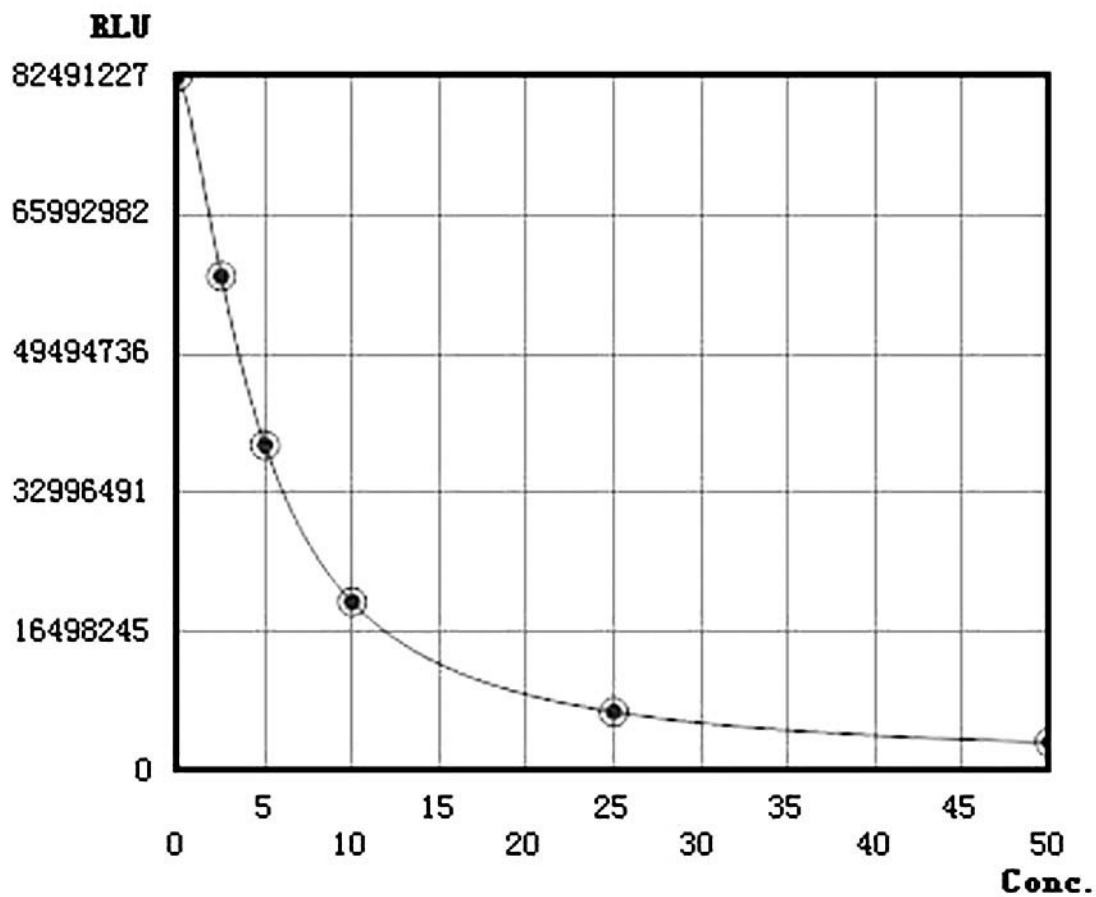


图1

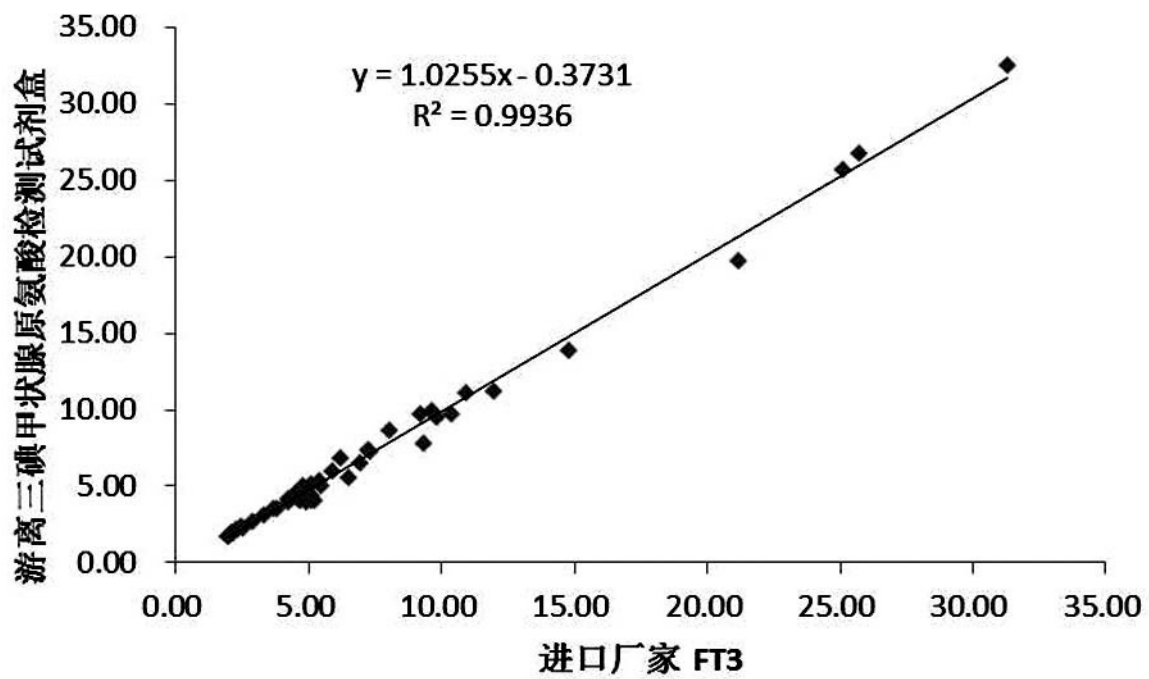


图2

专利名称(译)	用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液		
公开(公告)号	CN109254145A	公开(公告)日	2019-01-22
申请号	CN201811325407.6	申请日	2018-11-08
[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	宋书杰 高远鹰 佟欢 任永茂 靳增明 付光宇 吴学炜		
发明人	宋书杰 高远鹰 佟欢 任永茂 靳增明 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/76 G01N33/6812		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于改善新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液，包括0.05M Tris-NaCl缓冲液，所述0.05M Tris-NaCl缓冲液中，按照重量体积比，含有0.05%-0.3%的肝素钠，1%-20%的海藻糖和1-10%的牛免疫球蛋白G。与现有技术相比，本发明提供了一种易于实施并且可以用于改善免疫测定中新鲜血清和第三方质控之间基质效应的稀释液，检测时可与其他试剂组分同时加入，便于进行自动化操作，同时该稀释液配方中各成分对环境和生物体危害较小。使用时，可作为标记抗体或抗原的稀释液、也可作为偶联包被抗原或抗体磁性小球的保存液加入反应体系中。

