



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109828119 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910145636.8

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2019.02.27

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 武汉原谷生物科技有限责任公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号武汉国家生物产
业(九峰创新)基地B6栋2楼B111室

(72)发明人 熊雨胜 张薇 周欢 丁章成
江月 闫虎山

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限
公司 31253

代理人 冯子玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻
断试剂及其应用

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,包括主动阻断剂和被动阻断剂,所述主动阻断剂包括如下组分:第一缓冲溶液10-50mmol/L、NaCl 150-500mmol/L、单克隆抗体或多克隆抗体3-6mg/ml;所述被动阻断剂包括如下组分:第二缓冲溶液10-50mmol/L、NaCl 150-500mmol/L,免疫球蛋白4-9mg/mL。使用时,将主动阻断剂和被动阻断剂按一定比例混合后无菌过滤,直接加入到检测系统,可以消除各类内源性干扰造成的假性结果,同时不影响正常反应曲线;加入时只需要极少的剂量,高效方便。

1. 一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,其特征在于,包括主动阻断剂和被动阻断剂,所述主动阻断剂包括如下组分:第一缓冲溶液10-50mmol/L、NaCl 150-500mmol/L、单克隆抗体或多克隆抗体3-6mg/ml;所述被动阻断剂包括如下组分:第二缓冲溶液10-50mmol/L,NaCl 150-500mmol/L,免疫球蛋白4-9mg/mL。

2. 根据权利要求1所述的一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,其特征在于,所述第一缓冲液选自磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液中的一种,所述第一缓冲液的pH值为7.2-7.6。

3. 根据权利要求1所述的一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,其特征在于,所述单克隆抗体选自抗HAMA单克隆抗体、抗RF因子单克隆抗体和抗HA单克隆抗体中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,其特征在于,所述多克隆抗体选自抗HAMA多抗、抗RF因子多抗和抗HA多抗中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,其特征在于,所述第二缓冲液选自磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液中的一种,所述第二缓冲液的pH值为7.2-7.6。

6. 根据权利要求1所述的一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,其特征在于,所述免疫球蛋白选自小鼠IgG、兔IgG、山羊IgG、牛IgG和人IgG中的至少一种。

7. 如权利要求1-6任一项所述的消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂在制备免疫层析检测试剂盒、酶免检测试剂盒、化学发光试剂盒、免疫比浊检测试剂盒中的应用。

8. 一种用于免疫检测的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,其特征在于,所述阻断剂包括权利要求1-6任一项所述的消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂。

9. 一种如权利要求1-6任一项所述的用于消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂的使用方法,其特征在于,选自下述方法中的一种:

方法一:应用于免疫层析检测试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到标记物垫或样本垫处理液中;

方法二:应用于酶免检测试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到样本稀释液或酶标液中;

方法三:应用于化学发光试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到磁珠液或标记物液;

方法四:应用于免疫比浊检测试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到R1工作液中。

10. 根据权利要求9所述的用于消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂的使用方法,其特征在于,所述混合型阻断试剂浓度为10-15mg/ml。

消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂及其应用。

背景技术

[0002] 随着科学技术的不断发展,免疫学检测方法已经广泛的应用于体外诊断试剂。但是任何免疫检测方法都有可能受到干扰出现假阳性或假阴性的结果,其中内源性干扰往往是由于试剂中使用的抗体与病人样本中的内源性物质发生交叉反应所致,这类干扰统称为内源性干扰。最易受到干扰的为基于双抗体夹心法、竞争抑制法的免疫比浊、侧向层析、化学发光及,酶联免疫方法等,此外,IgM检测试剂亦会受到这类物质的干扰。内源性干扰物质主要分为以下几类:

[0003] 1. 类风湿因子(RF)

[0004] 类风湿因子是存在于血清中的一类以自身变性IgG为靶抗原的自身抗体,与天然IgG结合能力较差,易与人和动物的变性IgG或免疫复合物中的IgG结合。RF主要分为IgM、IgA、IgG、IgD、IgE五型,其中68%-80%为IgM型。RF的干扰发生具有随机性,与RF浓度无相关性。

[0005] 目前当临床中遇到类风湿因子阳性标本时,会对标本进行预处理,比如在阳性标本中加入变性IgG,混匀后37℃水浴30min,离心后取上清检测。

[0006] 2. 异嗜性抗体(HA)

[0007] 异嗜性抗体可以与许多动物免疫球蛋白的Fc和Fab等部位上的表位结合,模拟被测抗原的免疫活性,同时结合捕获抗体、标记抗体干扰实验。异嗜性抗体对免疫球蛋白具有多特异性,但其亲和力较弱。其免疫干扰的程度与频率与自身的浓度、亲和力及检测系统等有关。

[0008] 3. 人抗动物抗体(HAAA)

[0009] 人抗动物抗体是具有抗动物活性的抗体,由医源性与非医源性二种途径引起。其中最常见的人抗小鼠抗体(HAMA)。人抗动物抗体针对明确的抗原,亲和力较强。

[0010] 传统解决内源性干扰的方法有以下几种:

[0011] 倍比稀释样品:对样本进行倍比稀释时,结果也应当呈现线性降低。通过倍比稀释样本,如果样本检测结果呈现线性,则样本并未收到内源性物质的干扰;如果稀释倍数较低时非线性,继续稀释高倍数时,接近线性,说明已经逐渐减弱了干扰,从而乘以稀释倍数即为真实结果。当然,此法对于一些干扰较为严重的样本,在进行稀释后仍然可能干扰结果。

[0012] 物理化学技术的应用:通过高速离心、样本加热、三氯乙酸沉淀、加入PEG、巯基还原等亦可以降低干扰的发生。但是现在随着体外诊断试剂的发展,快速诊断越来越受到广泛的关注。这些技术虽然有效,但是步骤繁琐,并不适用于高通量的检测。

[0013] 使用阻断剂:目前市场上使用较为广泛的有HBR与IIR 2等阻断剂,对于一些样本,使用这两种阻断剂可以在一定程度上降低内源性物质的干扰。但是通过研究发现,并不是

所有的免疫干扰均可以去除。

[0014] 通过对于干扰因子及产生干扰原理的研究,我们设计开发一种专门针对体外免疫检测过程中各类内源性干扰物质的混合型阻断剂,能消除各类干扰造成的假性结果。这种阻断剂只可直接加入到检测系统,可以消除各类内源性干扰;同时不影响正常反应曲线;加入时只需要极少的剂量,高效方便。

发明内容

[0015] 针对现有技术中存在的技术问题,本发明提出了一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂及其应用,将这种阻断剂直接加入到检测系统,可以消除各类内源性干扰造成的假性结果,同时不影响正常反应曲线;加入时只需要极少的剂量,高效方便。

[0016] 为实现上述目的,本发明是通过以下技术方案实现的:

[0017] 本发明的第一个目的在于提出一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂,包括主动阻断剂和被动阻断剂,所述主动阻断剂包括如下组分:第一缓冲溶液10-50mmol/L、NaCl 150-500mmol/L、单克隆抗体或多克隆抗体3-6mg/ml;所述被动阻断剂包括如下组分:第二缓冲溶液10-50mmol/L,NaCl150-500mmol/l,免疫球蛋白4-9mg/mL。

[0018] 进一步地,所述第一缓冲液选自磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液中的一种,所述第一缓冲液的pH值为7.2-7.6。

[0019] 进一步地,所述单克隆抗体选自抗HAMA单克隆抗体、抗RF因子单克隆抗体和抗HA单克隆抗体中的至少一种。

[0020] 进一步地,所述多克隆抗体选自抗HAMA多抗、抗RF因子多抗和抗HA多抗中的至少一种。

[0021] 进一步地,所述第二缓冲液选自磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液中的一种,所述第二缓冲液的pH值为7.2-7.6。

[0022] 进一步地,所述免疫球蛋白选自小鼠IgG、兔IgG、山羊IgG、牛IgG和人IgG中的至少一种。

[0023] 本发明的第二个目的在于提出上述任一项所述的消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂在制备免疫层析检测试剂盒、酶免检测试剂盒、化学发光试剂盒、免疫比浊检测试剂盒中的应用。

[0024] 本发明的第三个目的在于提出一种用于免疫检测的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,所述阻断剂包括上述任一项所述的消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂。

[0025] 本发明的第四个目的在于提出一种上述任一项所述的用于消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂的使用方法,选自下述方法中的一种:

[0026] 方法一:应用于免疫层析检测试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到标记物垫或样本垫处理液中;

[0027] 方法二:应用于酶免检测试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到样本稀释液或酶标液中;

[0028] 方法三:应用于化学发光试剂盒中,按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂,将混合型阻断试剂加入到磁珠液或酶标液中;

[0029] 方法四：应用于免疫比浊检测试剂盒中，按一定比例混合主动阻断剂和被动阻断剂后无菌过滤得混合型阻断试剂，将混合型阻断试剂加入到R1工作液中。

[0030] 进一步地，所述混合型阻断试剂浓度为10-15mg/ml，有利于抗体的稳定性。

[0031] 原理说明：

[0032] 本发明中被动阻断剂中主要为各类动物IgG，对于样本中的人抗动物抗体(HAAA)等内源性干扰，有着突出的作用；主动阻断剂为一类专门针对类风湿因子(RF)与异嗜性抗体(HA)等内源性干扰的抗体，可以对其进行主动性中和，使用浓度较低。被动阻断剂和主动阻断剂的组合使用可以最大限度的优化检测系统，提升混合型阻断剂的阻断效果。

[0033] 与现有技术相比，本发明的有益效果在于：

[0034] (1) 本发明的用于体外诊断试剂消除内源性干扰的混合型阻断剂，包括主动阻断剂和被动阻断剂两个部分，按一定比例混合后无菌过滤，浓度控制在10-15mg/ml，有利于抗体的稳定性。使用时，预先将混合型阻断剂加入到样品处理液中，通过调整阻断剂使用浓度可以有效的降低样本内源性干扰对检测系统的影响，提高检测的准确性。

[0035] (2) 本发明的混合阻断剂中，主动阻断剂是一种或多种专门针对这种内源性干扰的特异性抗体，比起针对内源性干扰的处理方式和传统的阻断试剂，有以下优势：简易使用，直接添加使用；高效能、低剂量，只需很少即可去除各类内源性干扰；不影响正常反应曲线，对正常标本的信号并无影响。

具体实施方式

[0036] 展示一下实例来具体说明本发明的某些实施例，且不应解释为限制本发明的范围。对本发明公开的内容可以同时从材料、方法和反应条件进行改进，所有这些改进，均应落入本发明的精神和范围之内。本发明所用试剂和原料均市售可得或可按文献方法制备。

[0037] 实施例1：

[0038] 一种用于免疫检测系统的阻断试剂，所述的阻断剂成分包括主动阻断剂和被动阻断剂二种成分，将二者混合后保存于盒体中备用，其中主动阻断剂和被动阻断剂中各个成分含量如下：

[0039] 表1

[0040]

组分 (mg/ml)	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5	配方 6	配方 7
小鼠 IgG	5	5	4	0	0	3	2
山羊 IgG	2	1	0	4	0	3	0
兔 IgG	0	2	0	0	4	0	5
牛 IgG	0	1	5	1	2	0	0
人 IgG	0	0	0	1	1	1	0
抗 RF 因子抗体	2	2	2	2	2	2	2
抗 HA 抗体	0	2	2	0	2	2	2
抗 HAMA 抗体	1	0	2	4	2	0	1
第一/第二 缓冲液	10mM PB	20mM Tris-Hcl	50mM PB	20mM Tris-Hcl	10mM PB	20mM Tris-Hcl	40mM PB
NaCl	0.15M	0.30M	0.15M	0.50M	0.20M	0.50M	0.30M

[0041] 如上表所示,显示了混合型阻断剂中各种被动阻断剂成分与主动阻断剂的成分比例。其中,各种配方的阻断剂可以单独使用,亦可以复合叠加使用。本发明的主动阻断剂与被动阻断剂使用范围应当通过梯度实验确定,首次使用浓度从较高浓度开始,确定有效果后再梯度稀释至较低浓度。

[0042] 取已经经过验证的六份内源性干扰血清及一份健康无干扰样本作为研究对象,在TSH项目(双抗体夹心法,定量酶联免疫)上测试阻断剂配方1、配方2、配方3、配方6、配方7的阻断效果,各配方阻断剂总使用浓度为100ug/ml,添加至酶标稀释液中使用,对样本进行测试,结果如下:

[0043] 表2TSH项目上不同配方阻断剂的阻断效果对比(定量酶联免疫)

[0044]

TSH 项目上不同配方阻断剂的阻断效果对比 (定量酶联免疫)							
样本号	配方 1	配方 2	配方 3	配方 6	配方 7	无阻断剂	实际值
1	0.47	0.44	0.43	0.67	0.55	3.14	0.44
2	0.17	0.19	0.22	0.24	0.17	2.63	0.15
3	0.12	0.13	0.09	0.15	0.11	2.56	0.07
4	0.34	0.41	0.37	0.43	0.36	2.18	0.37
5	0.21	0.24	0.35	0.27	0.32	1.84	0.25
6	0.13	0.11	0.16	0.18	0.12	0.53	0.09
7	0.06	0.06	0.11	0.10	0.11	0.08	0.07

[0045] 如上表所示,在酶免系统HbeAg项目上,本发明所述的复合型阻断剂能够大大降低内源性物质干扰的产生,测试样本的检测结果同实际值结果接近,不会影响结果的正常值,结果的准确性有了大大的提升。

[0046] 选取了已经经过验证的五份内源性干扰血清及二份无干扰样本作为研究对象,在心肌项目(双抗体夹心法,半定量胶体金)上测试阻断剂配方3、配方4、配方5、配方6、配方7的阻断效果,各阻断剂使用浓度为100ug/ml,添加至标记物垫处理液中使用,对样本进行测试

试,结果如下:

[0047] 表3心肌项目上不同配方阻断剂阻断效果对比(半定量胶体金)

[0048]

心肌项目上不同配方阻断剂阻断效果对比(半定量胶体金)							
样本号	配方 3	配方 4	配方 5	配方 6	配方 7	无阻断剂	实际值
1	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	+	-	-	++	-
3	-	-	+	+	+	++	+
4	+	+	++	++	+	+++	++
5	-	-	+	+	+	+++	-
6	++	++	++	++	++	++	++
7	-	-	-	-	-	-	-

[0049] 注:++代表T线与C线的色度对比。“-”表示T线不明显;“+”代表T线明显浅于C线“++”T线与C线相当;“+++”代表T线比C线深。

[0050] 如上表(表2和表3)所示,在该实施例中,7种不同的阻断剂均可以阻断内源性样本的干扰,其中对本实施例而言,配方1、配方2的阻断剂效果较优,其结果与实际值接近。对于两份无干扰的样本结果显示,所有阻断剂并不会压低信号值或者引起正常结果的增高,这样大大提升了样本检测结果的准确性和稳定性。

[0051] 实施例2:

[0052] 选取了已经经过验证的五份内源性干扰血清及二份无干扰样本作为研究对象,在HBeAg项目(双抗体夹心法,化学发光)测试阻断剂配方1、配方2、配方3、配方6、配方7的阻断效果,各阻断剂使用浓度为100ug/ml,添加至标记物液中使用,对样本进行测试,结果如下:

[0053] 表4HBeAg项目上不同配方阻断剂阻断效果对比(化学发光)

[0054]

HBeAg 项目上不同配方阻断剂阻断效果对比(化学发光)							
样本号	配方 1	配方 2	配方 3	配方 6	配方 7	无阻断剂	实际值
1	0.035	0.031	0.025	0.041	0.037	0.125	0.030
2	0.052	0.051	0.074	0.057	0.067	0.247	0.045
3	0.102	0.112	0.137	0.154	0.171	0.714	0.117
4	0.207	0.221	0.234	0.247	0.241	0.871	0.228
5	0.564	0.575	0.579	0.602	0.589	2.144	0.547
6	1.765	1.760	1.774	1.782	1.762	1.763	1.764
7	0.012	0.013	0.015	0.017	0.011	0.012	0.012

[0055] 如上表所示,在化学发光系统中HBeAg项目上评价上面五种阻断剂的阻断效果,其中对于五份内源性干扰血清样本,阻断剂都可以有效的降低内源性的干扰,其测定结果与实际值接近。对于两份无干扰的血清样本,结果显示,阻断剂并没有增加其信号值或者压低其正常值,对于试剂盒结果的准确性于稳定性有着良好的加强作用。

[0056] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂及其应用		
公开(公告)号	CN109828119A	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910145636.8	申请日	2019-02-27
[标]发明人	张薇 周欢 江月 闫虎山		
发明人	熊雨胜 张薇 周欢 丁章成 江月 闫虎山		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/573 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，更具体地，涉及一种消除体外诊断试剂内源性干扰的混合型阻断试剂，包括主动阻断剂和被动阻断剂，所述主动阻断剂包括如下组分：第一缓冲溶液10-50mmol/L、NaCl 150-500mmol/L、单克隆抗体或多克隆抗体3-6mg/ml；所述被动阻断剂包括如下组分：第二缓冲溶液10-50mmol/L，NaCl 150-500mmol/l，免疫球蛋白4-9mg/mL。使用时，将主动阻断剂和被动阻断剂按一定比例混合后无菌过滤，直接加入到检测系统，可以消除各类内源性干扰造成的假性结果，同时不影响正常反应曲线；加入时只需要极少的剂量，高效方便。

组分 (mg/ml)	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5	配方 6	配方 7
小鼠 IgG	5	5	4	0	0	3	2
山羊 IgG	2	1	0	4	0	3	0
兔 IgG	0	2	0	0	4	0	5
牛 IgG	0	1	5	1	2	0	0
人 IgG	0	0	0	1	1	1	0
抗 RF 因子抗体	2	2	2	2	2	2	2
抗 HA 抗体	0	2	2	0	2	2	2
抗 HAMA 抗体	1	0	2	4	2	0	1
第一/第二 缓冲液	10mM PB	20mM Tris-Hcl	50mM PB	20mM Tris-Hcl	10mM PB	20mM Tis-Hcl	40mM PB
NaCl	0.15M	0.30M	0.15M	0.50M	0.20M	0.50M	0.30M