



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107576785 A

(43)申请公布日 2018.01.12

(21)申请号 201710743976.1

(22)申请日 2017.08.25

(71)申请人 广州市雷德生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业  
开发区揽月路80号科技创新基地D区  
701

(72)发明人 茹志伟 杨翔 黄小燕 周单  
楼建荣

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种样本处理液及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种样本处理液及其应用。所述样本处理液至少包括金属螯合剂和pH缓冲液。本发明提供的样本处理液及其应用利用酶联免疫吸附法的原理,在检测血清和/或血浆样本中的抗原和/或抗体时能降低干扰,提高检测的灵敏度;本发明的样本处理液能用于含有免疫复合物、抗原表位隐藏或聚集、补体等一种或至少两种干扰同时存在时的血清和/或血浆样本处理,降低非特异性,降低背景值,提高抗原抗体检测的灵敏度和准确度。

1. 一种样本处理液,其特征在于,所述样本处理液包括以下组分:金属螯合剂和pH缓冲液。
2. 如权利要求1所述的样本处理液,其特征在于,所述金属螯合剂为有机金属螯合剂,优选为羧酸型螯合剂,进一步优选为乙二胺四乙酸及其盐、氨基三乙酸及其盐、二亚乙基三胺五乙酸及其盐、柠檬酸、酒石酸、葡萄糖酸、羟乙基乙二胺三乙酸或二羟乙基甘氨酸中的任意一种或至少两种的混合物。
3. 如权利要求1或2所述的样本处理液,其特征在于,所述金属螯合剂的浓度为1.0mM以上,优选为1.5-100.0mM,进一步优选为2.0-20.0mM。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的样本处理液,其特征在于,所述pH缓冲液使得所述样本处理液在加入血清和/或血浆样本后,所述血清和/或血浆样本的pH保持在5.0-9.0,优选为6.0-8.0,进一步优选为6.5-7.5。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的样本处理液,其特征在于,所述pH缓冲液为Tris-HCl、PBS缓冲液、磷酸盐缓冲液或醋酸盐缓冲液中的任意一种或至少两种的组合,优选为Tris-HCl。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的样本处理液,其特征在于,所述样本处理液还包括表面活性剂。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的样本处理液,其特征在于,所述表面活性剂为Triton X-100和/或吐温20。
8. 一种如权利要求1-7中任一项所述的样本处理液在处理血清和/或血浆样本方面的应用。
9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,所述样本处理液与所述血清和/或血浆样本的体积比为(1-50):1,优选为(5-20):1,进一步优选为(6-15):1。
10. 如权利要求8或9所述的应用,其特征在于,所述血清和/或血浆样本用于抗原抗体的检测。

## 一种样本处理液及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗原抗体检测领域,具体涉及一种样本处理液及其应用。

### 背景技术

[0002] 免疫分析因其灵敏度高,且无需提前从样本中提取待测物而被广泛应用。然而,在免疫分析的过程中存在的干扰会严重影响分析物的测定结果,降低了测定的特异性和准确性。因此,有必要对影响测定结果的因素(即干扰)进行分析并通过优化程序予以解决,从而避免不必要的临床检查和不合理的治疗。

[0003] 血清和/或血浆样本中的抗原或抗体部分以免疫复合物(即抗原-抗体复合物)的形式存在;因此单独检测抗原或抗体时,结果都会受到免疫复合物的干扰。机体内的免疫复合物主要以两种方式存在:一种是存在于血液中的循环免疫复合物(circulating immune complex,CIC),一种是组织中的固定免疫复合物。人体在健康状态下也存在少量的CIC(约10~20 $\mu$ g/ml),因而CIC的生理与病理界限难以区分。目前,已经明确系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、部分肾小球肾炎和血管炎等疾病为免疫复合物病;在发现紫癜、关节痛、蛋白尿、血管炎和浆膜炎等情况时,可考虑免疫复合物病的可能性。另外,患有恶性肿瘤时CIC检出率也增高。

[0004] 抗原检测中还会遇到由于抗原表位被封闭而降低检测结果或出现假阴性的现象,例如在免疫组化组织的制备过程中,由于化学试剂的作用封闭了抗原,又由于热的作用致使部分抗原的肽链发生扭曲致使在免疫组化的染色过程中不能将其显示出来,因此需要进行抗原修复。抗原决定簇(即抗原表位)是抗原表面决定抗原性的特殊集团,一般为糖链、脂链或特殊的化学功能集团。抗原决定簇大多存在于抗原物质的表面,有些存在于抗原物质的内部,须经酶或其他方式处理后才暴露出来。在某些情况下,例如蛋白质发生交联或聚集,蛋白质结构发生改变或以不同的方式重新折叠,蛋白氨基酸发生修饰带电性发生改变或由亲水性质变为疏水性质等,蛋白质的抗原表位会被隐藏导致抗原检测值降低。

[0005] 此外,某些免疫分析还受到补体的干扰,Artiss等观察到一些血清促甲状腺激素的免疫检测存在假阴性干扰,这种假阴性干扰可能是由于补体影响产生等。包被抗体的固相载体也可能与补体结合,Käpyaho等在用包被单克隆抗体的磁珠检测促甲状腺激素时发现检测受到抑制,这种抑制在孵育时加入乙二胺四乙酸(EDTA)或白蛋白-抗白蛋白抗体免疫复合物后消除,随后证实是由于补体与包被单抗的磁珠结合所致。补体增高见于骨髓炎、类风湿性关节炎、系统红斑狼疮、血管炎、硬皮病、痛风、活动性过敏性紫癜。分离血清中的补体是不稳定的,容易在长期储存和反复冻融过程中逐渐消失,因此由于补体产生的假阴性干扰主要存在于新鲜血清样本中。

[0006] 专利申请CN 103674657 A公开了一种血清或血浆样本中的免疫复合物处理试剂盒,仅适用于疑似产生免疫复合物而影响检测效果的血清和/或血浆样本的处理,其能有效解离样本中已形成的免疫复合物从而提高样本的检测灵敏度;而当血清和/或血浆样本存在上述的抗原表位被封闭(隐藏或聚集)、补体等其他干扰或多种干扰同时存在时,仅通过

专利申请CN 103674657 A公开的试剂盒解离样本中已形成的免疫复合物不能有效降低干扰,无法提高检测的灵敏度。

### 发明内容

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种样本处理液及其应用,利用酶联吸附法原理,消除或降低血清和/或血浆样本中影响抗原抗体免疫检测灵敏度的因素的干扰,包括免疫复合物干扰、隐藏抗原表位干扰和补体干扰在内的一种或两种以上干扰样本的处理,从而达到提高抗原抗体免疫检测灵敏度和准确度的目的。

[0008] 为达此目的,本发明采用了以下技术方案:

[0009] 第一方面,本发明提供了一种样本处理液,所述样本处理液至少包括以下组分:金属螯合剂和pH缓冲液。

[0010] 其中,血清和/或血浆样本中的离子会影响抗原抗体反应,以及带电性和/或依赖金属离子的干扰物的活化,因此加入金属螯合剂能将低依赖金属离子类的干扰物质对于测定结果的干扰,pH缓冲液则能保证血清和/或血浆样本确保反应始终在最适pH范围内进行。

[0011] 优选地,所述金属螯合剂为有机金属螯合剂,优选为羧酸型螯合剂,进一步优选为乙二胺四乙酸及其盐、氨基三乙酸及其盐、二亚乙基三胺五乙酸及其盐、柠檬酸、酒石酸、葡萄糖酸、羟乙基乙二胺三乙酸或二羟乙基甘氨酸中的任意一种或至少两种的混合物;例如,可以是氨基三乙酸及其盐,二亚乙基三胺五乙酸及其盐,柠檬酸,乙二胺四乙酸及其盐和氨基三乙酸及其盐的混合物,或者酒石酸、葡萄糖酸、羟乙基乙二胺三乙酸和二羟乙基甘氨酸混合物;

[0012] 优选地,所述金属螯合剂的浓度为1.0mM以上,例如可以是1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM或150mM;优选为1.5-100.0mM,进一步优选为2.0-20.0mM。

[0013] 优选地,所述pH缓冲液使得所述样本处理液在加入血清和/或血浆样本后,所述血清和/或血浆样本的pH保持在5.0-9.0,例如可以是5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5或9.0,优选为6.0-8.0,进一步优选为6.5-7.5。

[0014] 优选地,所述pH缓冲液为Tris-HCl、PBS缓冲液、磷酸盐缓冲液或醋酸盐缓冲液中的任意一种或至少两种的组合,优选为Tris-HCl。

[0015] 优选地,所述样本处理液还包括表面活性剂。

[0016] 优选地,所述表面活性剂为Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)和/或Tween20(吐温20)。

[0017] 第二方面,本发明提供如第一方面所述的样本处理液在处理用于抗原抗体检测的血清和/或血浆样本方面的应用。

[0018] 优选地,所述样本处理液与所述血清和/或血浆样本的体积比为(1-50):1,例如可以是1:1、5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1或50:1,优选为(5-20):1,进一步优选为(6-15):1。

[0019] 优选地,所述血清和/或血浆样本用于抗原抗体的检测。

[0020] 在使用本发明的样本处理液对血清和/或血浆样本进行处理时,所使用的方法为

本领域的常规方法,在一个具体的实施例中,在样本处理液100-1000 $\mu$ l中加入血清和/或血浆样本10-1000 $\mu$ l进行稀释,充分震荡混合后即可用于常规的抗原和/或抗体的测定。

[0021] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0022] (1) 本发明提供的样本处理液及其应用利用酶联免疫吸附法的原理,在检测血清和/或血浆样本中的抗原和/或抗体时能降低干扰,提高检测的灵敏度;

[0023] (2) 本发明的样本处理液能用于含有免疫复合物、抗原表位隐藏或聚集、补体等一种或至少两种干扰同时存在时的血清和/或血浆样本处理,降低非特异性,降低背景值,提高抗原抗体检测的灵敏度和准确度。

### 具体实施方式

[0024] 为便于理解本发明,本发明列举实施例如下。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0025] 实施例1

[0026] 分别在浓度为25mM的Tris-HCl缓冲液中,加入EDTA,使样本处理液中EDTA的浓度为1.5mM。

[0027] 然后将制得的样本处理液900 $\mu$ l与健康人的血清样本100 $\mu$ l混合,充分震荡混匀,得到最终处理液。

[0028] 实施例2

[0029] 与实施例1相比,除样本处理液中EDTA浓度为100.0mM外,其余与实施例1相同。

[0030] 实施例3

[0031] 与实施例1相比,除样本处理液中EDTA浓度为25.0mM外,其余与实施例1相同。

[0032] 实施例4

[0033] 与实施例1相比,除样本处理液中EDTA浓度为5.0mM外,其余与实施例1相同。

[0034] 实施例5

[0035] 与实施例1相比,除样本处理液中EDTA浓度为20.0mM外,其余与实施例1相同。

[0036] 对比例1

[0037] 与实施例1相比,除血清和/或血浆样本处理液中不含EDTA外,其余与实施例1相同。

[0038] 对比例2

[0039] 与实施例1相比,除样本处理液中EDTA浓度为0.5mM外,其余与实施例1相同。

[0040] 实施例6

[0041] 分别用实施例1-5和对比例1-2制备的最终处理液加入微孔板进行孵育,经洗涤后加入酶标检测抗体,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测RA特异性自身抗原,经孵育、洗涤后加入TMB进行反应后,用酶标仪读取OD450值(空白对照OD值越低得出背景值越低,样本检测OD值越高得出灵敏度越高)。

[0042] 结果及分析:

[0043] 1) 检测RA特异性自身抗原背景的结果分析

[0044] 结果如表1所示:

[0045] 表1实施例1-5及对比例1-2对ELISA检测RA自身抗原背景结果

[0046] 表1

[0047]

测试对象	OD值
实施例1	0.035
实施例2	0.032
实施例3	0.029
实施例4	0.021
实施例5	0.023
对比例1	0.060
对比例2	0.055

[0048] 从表1中可以看出,实施例1-5相对于对比例1-2的背景值明显降低,说明EDTA对降低用于ELISA检测RA特异性自身抗原的背景有明显效果,从实施例1-5对比来看,随着EDTA的浓度调整到1.5-100mM,其背景值进一步降低,当EDTA的浓度为2-20mM时,其背景值最低。

[0049] 2) 检测RA特异性自身抗原灵敏度的结果分析

[0050] 测试结果如表2所示:

[0051] 表2实施例1-5及对比例1-2对ELISA检测RA自身抗原灵敏度结果

[0052] 表2

[0053]

测试对象	OD值
实施例1	1.48
实施例2	2.44
实施例3	2.76
实施例4	3.21
实施例5	3.13
对比例1	0.72
对比例2	0.96

[0054] 从表2中可以看出,实施例1-5相对于对比例1-2的灵敏度明显升高,说明EDTA对提高用于ELISA检测RA特异性自身抗原的灵敏度有明显效果,从实施例1-5对比来看,随着EDTA的浓度调整到1.5-100mM,其灵敏度进一步提高,当EDTA的浓度为2-20mM时,其灵敏度最高。

[0055] 实施例7

[0056] 在浓度为8mM的EDTA溶液900 $\mu$ l中加入健康人的血清样本100 $\mu$ l,得到处理液;然后将tris-HCL缓冲液加入上述处理液中,使pH达到5.0,充分震荡混匀,得到最终处理液。

[0057] 实施例8

[0058] 与实施例7相比,除使处理液pH达到9.0外,其余与实施例7相同。

[0059] 实施例9

[0060] 与实施例7相比,除使处理液pH达到6.0外,其余与实施例7相同。

[0061] 实施例10

[0062] 与实施例7相比,除使处理液pH达到7.0外,其余与实施例7相同。

[0063] 实施例11

[0064] 与实施例7相比,除使处理液pH达到8.0外,其余与实施例7相同。

[0065] 实施例12

[0066] 与实施例7相比,除使处理液pH达到7.5外,其余与实施例7相同。

[0067] 对比例3

[0068] 与实施例7相比,除使处理液pH达到10.0外,其余与实施例7相同。

[0069] 对比例4

[0070] 与实施例7相比,除使处理液pH达到4.0外,其余与实施例7相同。

[0071] 实施例13

[0072] 分别用实施例7-12和对比例3-4制备的最终处理液加入微孔板进行孵育,经洗涤后加入酶标检测抗体,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测RA特异性自身抗原,经孵育、洗涤后加入底物TMB进行反应后,用酶标仪读取OD450值。

[0073] 结果及分析:

[0074] 1) 检测RA特异性自身抗原背景的结果分析

[0075] 结果如表3所示:

[0076] 表3实施例7-12及对比例3-4对ELISA检测RA自身抗原背景结果

[0077] 表3

[0078]

测试对象	OD值
实施例7	0.035
实施例8	0.032
实施例9	0.029
实施例10	0.031
实施例11	0.032
实施例12	0.029
对比例3	0.089
对比例4	0.077

[0079] 从表3中可以看出,实施例7-12相对于对比例3-4的背景值明显降低,说明处理液的pH处于5.0-9.0时,使用处理液对降低用于ELISA检测RA特异性自身抗原的背景有明显效果,从实施例7-12对比来看,随着pH的调整到6-8,其背景值进一步降低,当pH为6.5-7.5时,其背景值最低。

[0080] 2) 检测RA特异性自身抗原灵敏度的结果分析

[0081] 测试结果如表4所示:

[0082] 表4实施例7-12及对比例3-4对ELISA检测RA自身抗原灵敏度结果

[0083] 表4

	测试对象	OD 值
[0084]	实施例 7	0.034
	实施例 8	0.031
	实施例 9	0.028
	实施例 10	0.030
	实施例 11	0.030
[0085]	实施例 12	0.028
	对比例 3	0.088
	对比例 4	0.075

[0086] 从表4中可以看出,实施例7-12相对于对比例3-4的灵敏度明显升高,说明处理液的pH处于5.0-9.0时,对提高用于ELISA检测RA特异性自身抗原的灵敏度有明显效果,从实施例7-12对比来看,随着pH的调整到6-8,其灵敏度进一步提高,当pH为6.5-7.5时,其灵敏度最高。

[0087] 实施例13-20本发明的血清和/或血浆样本处理液对高脂,高补体类类风湿性关节炎(RA)样本自身抗原检测灵敏度的作用

[0088] 1) 血清和/或血浆样本的处理:

[0089] 在浓度为25mM的tris-HCL缓冲液中,加入EDTA使其终浓度达到8mM,制成血清样本处理液;然后采集不同样本的RA患者的血清样本,如表5所示,取100 $\mu$ l的血清样本加入到900 $\mu$ l上述血清样本处理液中,充分震荡混匀,得到最终处理液。

[0090] 表5实施例13-20不同的血清样本

[0091]	实施例 13	自身抗体阳性
	实施例 14	自身抗体阳性
	实施例 15	自身抗体阳性
	实施例 16	自身抗体阳性, 高脂
	实施例 17	自身抗体阳性, 高脂
	实施例 18	补体含量高
	实施例 19	补体含量高
[0092]	实施例 20	补体含量高

[0093] 2) 采用酶联免疫吸附法检测RA特异性自身抗原的灵敏度,若检测OD值升高,背景

值降低则反映灵敏度提高：

[0094] 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测RA特异性自身抗原，将实施例13-20的最终处理液加入微孔板进行孵育，经洗涤后加入酶标检测抗体，经孵育、洗涤后加入底物反应，终止反应，酶标仪读取OD值，结果如表6所示。

[0095] 表6实施例13-20对不同的类风湿性关节炎 (RA) 样本自身抗原灵敏度的检测结果

[0096]

实施例	原始OD值	处理后OD值
实施例13	0.15	0.21
实施例14	0.16	0.38
实施例15	0.21	0.44
实施例16	0.36	0.75
实施例17	0.37	0.78
实施例18	0.33	0.80
实施例19	0.56	0.96
实施例20	0.57	1.05

[0097] 从表6可以得出，与处理前检测的灵敏度比较，采用实施例13-20的血清样本处理液处理的不同RA患者的血清样本的灵敏度均有不同程度的提高，灵敏度提高的比例为46%-156%。

[0098] 综上所述，本发明提供的样本处理液及其应用利用酶联免疫吸附法的原理，在检测血清和/或血浆样本中的抗原和/或抗体时能降低干扰，提高检测的灵敏度；本发明的样本处理液能用于含有免疫复合物、抗原表位隐藏或聚集、补体等一种或至少两种干扰同时存在时的血清和/或血浆样本处理，降低非特异性，降低背景值，提高抗原抗体检测的灵敏度和准确度。

[0099] 申请人声明，本发明通过上述实施例来说明本发明的详细工艺流程，但本发明并不局限于上述详细工艺流程，即不意味着本发明必须依赖上述详细工艺流程才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本发明的任何改进，对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

专利名称(译)	一种样本处理液及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107576785A</a>	公开(公告)日	2018-01-12
申请号	CN201710743976.1	申请日	2017-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	广州市雷德生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市雷德生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市雷德生物科技有限公司		
[标]发明人	茹志伟 杨翔 黄小燕 周单 楼建荣		
发明人	茹志伟 杨翔 黄小燕 周单 楼建荣		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种样本处理液及其应用。所述样本处理液至少包括金属螯合剂和pH缓冲液。本发明提供的样本处理液及其应用利用酶联免疫吸附法的原理，在检测血清和/或血浆样本中的抗原和/或抗体时能降低干扰，提高检测的灵敏度；本发明的样本处理液能用于含有免疫复合物、抗原表位隐藏或聚集、补体等一种或至少两种干扰同时存在时的血清和/或血浆样本处理，降低非特异性，降低背景值，提高抗原抗体检测的灵敏度和准确度。

测试对象	OD 值
实施例 7	0.034
实施例 8	0.031
实施例 9	0.028
实施例 10	0.030