

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/577

G01N 33/544



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00130134.9

[43] 授权公告日 2003 年 8 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1117986C

[22] 申请日 2000.10.16 [21] 申请号 00130134.9

[71] 专利权人 北京市创伤骨科研究所

地址 100035 北京市西城区新街口东街 31 号

[72] 发明人 赵丹慧 李成文 张艳 姚力

审查员 汪妍瑜

[74] 专利代理机构 北京恒信悦达专利代理有限责  
任公司

代理人 刘俊

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 II 型胶原酶联免疫检测分析方法

[57] 摘要

本发明公开了一种 II 型胶原酶联免疫检测分析方法，利用一株单克隆抗体通过抗体包板、洗板、封板、加样、再加入同一株抗体、加入酶标二抗及底物液后加入终止液，测定吸光率等程序步骤，对关节炎患者活动物的血清进行 II 型胶原吸光度的测定，通过多组测定值与正常值进行比较，就可得出 II 型胶原含量得半定量结果，从而就可了解软骨降解的病理变化规律，正确评价手术效果，具有广泛的应用意义。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种II型胶原酶联免疫检测分析方法，其特征在于：包括下列步骤：

(1)、包板：用PH=9.6、50mmol/L的碳酸盐缓冲液稀释鼠抗人II型胶原II—4C11单克隆抗体，浓度为4 $\mu$ g/ml，将抗体包被液加入酶联板中200 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C条件下放置1小时，或4 $^{\circ}$ C条件下过夜；

(2)、洗板：将板内包被液弃去，用洗板机每孔加入洗液300 $\mu$ l，洗板3次；如人工洗板，则洗板5次，每次放置5分钟；

(3)、封板：每孔加入灭活正常兔血清封板液200 $\mu$ l，在室温条件下保存2小时；

(4)、洗板：同步骤(2)，并将该板放入0—4 $^{\circ}$ C冰箱，待用；

(5)、加样：将人或动物样品及质控血清用分析缓冲液稀释50倍，然后取100 $\mu$ l分别加入每孔，放37 $^{\circ}$ C孵育2小时；

(6)、洗板：同步骤(2)；

(7)、加入抗体：将鼠抗人II型胶原II—4C11单克隆抗体用50mmol、PH=7.4分析缓冲液稀释成3 $\mu$ g/ml，向板中每孔加入100 $\mu$ l，在37 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时；

(8)、洗板：同步骤(2)；

(9)、用50mmol、PH=7.4分析缓冲液将羊抗鼠IgG做1：1000

的稀释，向板中每孔加入 100 $\mu$ l，在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 0.5 小时；

(10)、洗板：同步骤 (2)，反复洗 3 次；

(11)、取等体积 A、B 底物液混匀，每孔加入 200 $\mu$ l，在室温条件下放置 15—20 分钟；

(12)、加入终止液，每孔加入 50 $\mu$ l；

(13)、用酶免测定仪在 450nm 波长处测定吸光率。

2、根据权利要求 1 所述的 II 型胶原酶联免疫检测分析方法，其特征在于：所述封板液的配制为：将灭活正常兔血清在 62 $^{\circ}$ C 条件下放置 20 分钟，加入 0.05mol/L 固体 Tris，0.15mol/L 氯化钠 (NaCl) 及 2mol/L 氯化氢 (HCl)，将 PH 调至 8.0。

3、根据权利要求 1 所述的 II 型胶原酶联免疫检测分析方法，其特征在于：所述 A、B 底物液的配制组成为：

(1)、A 液：即：PH=5.0 柠檬酸—磷酸缓冲液的组成为：0.1mol/L 柠檬酸 24.3ml；0.2 mol/L 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 25.7ml；50ml 双蒸水，30%过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50 $\mu$ l；

(2)、B 液：即：配制 TMB 溶液：25mg 3', 3', 5', 5' 四甲基联苯胺 (TMB) 溶于 4ml 二甲基亚砷中，再加入 96ml、50mmol/L、PH=2.4 柠檬酸。

## II型胶原酶联免疫检测分析方法

### 技术领域:

本发明涉及免疫检测分析领域，具体涉及到一种II型胶原酶联免疫检测分析方法。

### 背景技术:

众所周知，II型胶原是一种大分子蛋白，主要存在于人体的透明软骨中，软骨中80—90%的结构成分是II型胶原，当骨性关节炎发生时，关节软骨降解，软骨中II型胶原丢失并释放进入血液，导致血液中II型胶原浓度增加。当前世界范围内老年人口逐年增加，随着社会的老龄化，骨性关节炎患者发病率呈明显上升趋势，目前，对于骨性关节炎的早期诊断、软骨降解的变化规律及关节炎手术后效果的判断等许多方面的国内外的研究都非常欠缺，其原因就是没有一种稳定性、敏感性及特异性都较高的测定软骨胶原含量的检测方法，近些年来，国内外学者对II型胶原含量的测定也进行了一些研究：1993年，美国杂志《免疫方法学》第159期上公开了一种用竞争酶联法测定II型胶原的方法，从理论上探讨了II型胶原测定的方法，但是，这种方法仅限于对细胞培养基中抗原的含量以及关节软骨样品中抗原含量的测定，而且测定结论对于了解关节软骨中软骨降解的病理变化规律，探讨早期诊断指标及关节病变的严重

程度，只能起到在理论上的分析研究的作用，应用范围较窄，如作为指导改进治疗方法的依据，则还不够全面和充分。在酶联免疫分析中，对于各类的抗原测定，通常采用的是双抗体夹心法，即选用两种不同的单克隆抗体对样品抗原进行夹心测定，这种测定方法需要选配同种异型抗 II 型胶原的抗体，比较复杂，当仅有一株抗体时这种方法就不能应用，使用范围受到限制。

发明内容：

本发明的目的是提供一种具有较高稳定性、灵敏度及特异性的 II 型胶原酶联免疫检测分析方法，利用该方法可以只用一株单克隆抗体就可夹心进行血清中 II 型胶原含量的测定。

本发明是利用多种试剂对酶联免疫用 96 孔板采用免疫学抗原检测原理，对血清样品中 II 型胶原测定，本发明的目的是通过下述方法来实现的，其特点在于包括下列步骤：

(1)、包板：用 PH=9.6、50mmol/L 的碳酸盐缓冲液稀释鼠抗人 II 型胶原 II—4C11 单克隆抗体，浓度为 4 $\mu$ g/ml，将抗体包被液加入酶联板中 200 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 条件下放置 1 小时，或 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜；

(2)、洗板：将板内包被液弃去，用洗板机每孔加入洗液 300 $\mu$ l，洗板 3 次；如人工洗板，则洗板 5 次，每次放置 5 分钟；

(3)、封板：每孔加入灭活正常兔血清封板液 200 $\mu$ l，在室温条件下保存 2 小时；

(4)、洗板：同步骤 (2)，并将该板放入 0—4 $^{\circ}$ C 冰箱，待用；

(5)、加样：将人或动物样品及质控血清用分析缓冲液稀释50倍，然后取100 $\mu$ l分别加入每孔，放37 $^{\circ}$ C孵育2小时；

(6)、洗板：同步骤(2)；

(7)、加入抗体：将鼠抗人II型胶原II-4C11单克隆抗体用50mmol、PH=7.4分析缓冲液稀释成3 $\mu$ g/ml，向板中每孔加入100 $\mu$ l，在37 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时；

(8)、洗板：同步骤(2)；

(9)、用50mmol、PH=7.4分析缓冲液将羊抗鼠IgG做1:1000的稀释，向板中每孔加入100 $\mu$ l，在37 $^{\circ}$ C条件下孵育0.5小时；

(10)、洗板：同步骤(2)，反复洗3次；

(11)、取等体积A、B底物液混匀，每孔加入200 $\mu$ l，在室温条件下放置15—20分钟；

(12)、加入终止液，每孔加入50 $\mu$ l；

(13)、用酶免测定仪在450nm波长处测定吸光率。

在上述步骤中，其中封板液的配制：将灭活正常兔血清在62 $^{\circ}$ C条件下放置20分钟后，加入0.05mol/L固体Tris, 0.15mol/L氯化钠(NaCl)及2mol/L氯化氢(HCl)，将PH调至8.0，制成封板液。

底物液的配制：

(1)、PH=5.0柠檬酸—磷酸缓冲液(A液)：0.1mol/L柠檬酸 24.3ml、0.2 mol/L磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 25.7ml、50ml双蒸水、30%过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50 $\mu$ l；

(2)、配制 TMB 溶液 (B 液): 25mg 3' 3' 5' 5' 四甲基联苯胺 (TMB) 溶于 4ml 二甲基亚砷中, 再加入 96ml、50mmol/L、PH=2.4 的柠檬酸。

用时取等体积 A、B 底物液混匀。

采用上述方法, 对骨性关节炎患者及正常人的血清样品进行 II 型胶原的半定量测定, 或者是对骨性关节炎手术前后血清样品进行 II 型胶原的测定, 以及对豚鼠血清样品中 II 型胶原的测定, 其结果是通过吸光率测定得出多组吸光度数值, 从而间接得出 II 型胶原的含量, 并通过多组数值的对比分析, 就可了解软骨降解的病理变化规律及关节病的严重程度, 并可作为改进治疗方法的依据。

由于本发明首次利用血清进行 II 型胶原酶联免疫测定, 并且只使用一株单克隆抗体进行对胶原含量的夹心测定, 使得在仅有一株单抗的有限条件下, 也可对 II 型胶原进行半定量的检测, 扩大了检测应用范围, 同时由于对血清能够进行 II 型胶原含量测定, 不但较准确地反映出手术前后软骨病理变化规律, 也可以正确评价手术效果, 既有重要的理论价值, 又有广泛的实际应用意义。

具体实施方式:

下面结合实施例详述本发明。

一、实验材料准备:

1、血清样品:

A、骨性关节炎患者血清 65 例;

正常人对照组血清 24 例;

B、骨性关节炎手术前血清 24 例;

骨性关节炎手术后血清 24 例;

C、骨性关节炎患者截骨术前、截骨术后半年、一年的血清样品各 11 份;

D、豚鼠血清样品包括 1 月龄 (正常软骨) 组、3 月龄 (破坏软骨) 组、8 月龄 (重度破坏软骨) 组, 每组 10 例。

2、酶联免疫标准用 96 孔板。

3、试剂制备:

(1)、鼠抗人 II 型胶原 II-4C11 单克隆抗体一株;

(2)、配制 PH=9.6, 50mmol/L 的碳酸盐包被缓冲液: 碳酸钠 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1.59g、碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 2.93g、加双蒸水 1000ml, 在 4℃ 条件下保存;

(3)、配制 PH=7.4 的磷酸盐缓冲液为洗板液 (PBST): 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ) 2g, 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2g, 磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 2.9g, 氯化钾 ( $\text{KCl}$ ) 0.2g, 加双蒸水 1000ml, 加吐温 20 (Tween) 试剂 0.5ml (加量要准), 在 4℃ 条件下保存;

(4)、封板液配制: 采用灭活正常兔血清, 将正常兔血清在 62℃ 条件下放置 20 分钟, 加入 0.05mol/L 固体 Tris, 0.15mol/L 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ) 及 2mol/L 氯化氢 ( $\text{HCl}$ ), 将 PH 调至 8.0, 制成封板液备用;

(5)、配制 50mmol/L、PH=7.4 的分析缓冲液 (PBS): 氯化

钠 (NaCl) 2g、磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2g、磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 2.9g、氯化钾 (KCl) 0.2g、牛血清蛋白 (BSA) 2g 及 9g 氯化钠 (NaCl)、加双蒸水 1000ml, 在 4℃ 条件下保存;

(6)、羊抗鼠 IgG 制备: 首先用盐析法纯化出正常鼠血清中的 IgG, 再按常量免疫法制备出羊抗鼠抗血清, 取出抗血清后; 再用盐析法分离纯化羊抗鼠 IgG, 放 20℃ 保存;

(7)、酶标羊抗鼠 IgG 的制备: 采用改良过碘酸钠法标记:

将 4mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 1ml 无离子水中;



将 0.2 ml 新鲜配制的 0.1 mol/L 的过碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ) 加入到 HRP 中, 室温下搅拌 20 分钟, 醛化 HRP 液, 用 PH=4.4、浓度为 1mmol/L 乙酸盐缓冲液透析, 4℃ 条件下过夜, 或 30 分钟换一次水透析 4 小时;



用 20 $\mu$ l、浓度为 0.2mol/L、PH=9.5 碳酸盐缓冲液将醛化 HRP 调节到 PH=9—9.5, 之后立即加入 1 毫升、浓度为 0.01mol/L、PH=9.5 羊抗鼠抗体 IgG 的碳酸盐缓冲液中, 将混合物室温搅拌两小时;



加入 0.1 ml、4mg/ml 新鲜配制的硼氢化钠溶液, 4℃ 条件下反应两小时;



标记物用磷酸缓冲液透析，再过 Sephadex G—200 柱，测定 280nm 和 403nm 光密度值后，加入 BSA 补到 10mg/ml 蛋白浓度，再分管低温保存、备用。

(8)、底物液的配制:

A 液: PH=5.0 柠檬酸—磷酸缓冲液 0.1mol/L、柠檬酸 24.3ml、0.2mol/L 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 25.7ml、50ml 双蒸水、30%过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50 $\mu$ l;

B 液: (TMB 溶液): 25mg 3' 3' 5' 5' 四甲基联苯胺 (TMB) 4ml, 二甲基亚砷再加入 96ml, 50mmol/L, PH=2.4 柠檬酸。

用时取等体积 A、B 底物液混匀。

(9)、终止液, 2mol/L 氯化氢 (HCl);

操作步骤:

采用本发明方法步骤 (1) — (13) 进行操作, 其中在步骤 (5) 中加入不同的经 50 倍稀释的各组血清样品, 分别进行 II 型胶原的测定, 得出不同的测试数据, 见下表:

表 1: 正常人与骨性关节炎患者血清指标的比较

项目	正常人 (n=24)	患者总数 (n=65)	A 组 (n=9)	B 组 (n=12)	C 组 (n=33)	D 组
II 型胶原 (OD450)	2.48±0.87	3.37±1.00	2.8±1.18	3.95±1.15	3.45±0.86	2.96±1.03

表 2: 骨性关节炎手术前、后血清指标的比较

全膝置换组 项目	手术前 (n=24)	手术后 (n=24)
II型胶原	3.47±0.84	3.11±0.98

表 3: 11例截骨术的骨性关节炎患者  
手术后半年、一年与术前显著性比较

项目	手术前	手术后半年	手术后一年
II型胶原	3.87±0.81	3.70±0.76	3.39±0.86

表 4: 在雌性豚鼠原发性骨性关节炎动物模型中的应用  
(不同阶段关节软骨与正常软骨的比较)

项目	1月龄, 电镜下 正常软骨(一组)	3月龄, 电镜下重度 破坏软骨(二组)	8月龄, 电镜下重度 破坏软骨(三组)
II型胶原 (OD450)	0.74±0.162	1.306±0.55	1.193±0.37

通过表 1 中的数值可看出患者及实验动物血清中 II 型胶原含量反映出的吸光度数值比正常人的数值明显增加，对于豚鼠动物的测定结果也证实了这个结论，而对于手术后患者血清中 II 型胶原含量的吸光度数值则明显低于手术前的患者，对于这些结论则证明了本发明具有较高的稳定性、灵敏度和特异性，其灵敏度在本实验使用的血清经 50 倍稀释后正常人范围 OD450 值在 A: 3.35—1.61 之间，而特异性在本方法与 I 型胶原的反应为 0.1%，精密度指标为：测定的批内变异系数为 6.3%，批间变异系数为 9.8 (n)，证明了本方法有很好的可重复性，稳定性高。

专利名称(译)	II型胶原酶联免疫检测分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1117986C</a>	公开(公告)日	2003-08-13
申请号	CN00130134.9	申请日	2000-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京市创伤骨科研究所		
申请(专利权)人(译)	北京市创伤骨科研究所		
当前申请(专利权)人(译)	北京市创伤骨科研究所		
[标]发明人	赵丹慧 李成文 张艳 姚力		
发明人	赵丹慧 李成文 张艳 姚力		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/544 G01N33/577		
代理人(译)	刘俊		
其他公开文献	CN1289924A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种II型胶原酶联免疫检测分析方法，利用一株单克隆抗体通过抗体包板、洗板、封板、加样、再加入同一株抗体、加入酶标二抗及底物液后加入终止液，测定吸光率等程序步骤，对关节炎患者活动物的血清进行II型胶原吸光度的测定，通过多组测定值与正常值进行比较，就可得出II型胶原含量得半定量结果，从而就可了解软骨降解的病理变化规律，正确评价手术效果，具有广泛的应用意义。