

[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

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00130134.9

[43] 公开日 2001 年 4 月 4 日

[11] 公开号 CN 1289924A

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

[71] 申请人 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 赵丹惠 李成文 张艳 姚力

[74] 专利代理机构 北京市科技专利事务所

代理人 刘俊

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图页数 0 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,对关节炎患者或动物的血清进行 II 型胶原吸光度的测定,通光多组测定值与正常值进行比较,就可得出 II 型胶原含量的半定量结果,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

# 权 利 要 求 书

---

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 Ph9.6, 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 4ug/ml，将抗体包被液加入酶联板中 200ul/孔，放 37℃1 小时，或放 4℃过夜；

(2) 洗板：将板内包被液弃去，用洗板机每孔加入洗液 300ul，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 200ul，放室温（25℃左右）2 小时；

(4) 洗板：同步骤（2）（将板放入 0—4℃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 100ul 分别加入每孔，放 37℃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-C411 单克隆抗体用 50mM, PH7.4 的分析缓冲液稀释成 3ug/ml，向板中每孔加入 100ul，放 37℃孵育 1 小时；

(8) 洗板：同步骤（2）；

(9) 用 50mM, PH7.4 的分析缓冲液将酶标羊抗鼠 IgG 做 1:1000 的稀释，向板中每孔加入 100ul，放 37℃孵育 0.5 小时；

(10) 洗板：同步骤（2）反复 3 次；

(11) 取等体积 A, B 底物液混均，每孔加入 200ul，放室温 15—20 分钟；

(12) 加入终止液，每孔 50ul；

(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 所述的检测分析方法，其特征在于：所述封板液的配制为：采用灭活正常兔血清：将正常兔血清放 62℃20 分钟，加入 0.05M 固体 Tris, 0.15M 氯化

纳 (NaCl) 及 2M 氯化氢 (HCL), 将 Ph 调至 8.0。

3. 根据权利要求 1 所述的检测分析方法, 其特征在于: 所述的底物液的配制为:

(1) Ph5.0 柠檬酸-磷酸缓冲液 (A 液): 0.1M 柠檬酸 24.3ml; 0.2M 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 25.7ml; 50ml 双蒸水, 30%过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50ul;

(2) 配制 TMB 溶液 (B 液): 25mg 3'3'5'5'四甲基联苯胺 (TMB) 溶于 4ml 二甲基亚砜中, 再加入 96ml 50mmol/L Ph2.4 柠檬酸。

# 说明书

---

## II型胶原酶联免疫检测分析方法

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。

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，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两株抗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。

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 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 Ph9.6, 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 4ug/ml，将抗体包被液加入酶联板中 200ul/孔，放 37℃1 小时，或放 4℃过夜。

(2)洗板：将板内包被液弃去，用洗板机每孔加入洗液 300ul，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 200ul，放室温（25℃左右）2 小时。

(4)洗板：同步骤（2）（将板放入 0—4℃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 100ul 分别加入每孔，放 37℃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-C411 单克隆抗体用 50mM, PH7.4 的分析缓冲液稀释成 3ug/ml，向板中每孔加入 100ul，放 37℃孵育 1 小时。

(8)洗板：同步骤（2）。

(9)用 50mM, PH7.4 的分析缓冲液将酶标羊抗鼠 IgG 做 1:1000 的稀释，向板中每孔加入 100ul，放 37℃孵育 0.5 小时。

(10)洗板：同步骤（2）反复 3 次。

(11)取等体积 A, B 底物液混均，每孔加入 200ul，放室温 15—20 分钟。

(12)加入终止液，每孔 50ul。

(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，采用灭活正常兔血清：将正常兔血清放 62℃20 分钟，加入 0.05M 固体 Tris, 0.15M 氯化钠 (NaCl) 及 2M 氯化氢 (HCL)，将 Ph 调至 8.0，制成封板液。

底物液的配制:

(1) Ph5.0 柠檬酸-磷酸缓冲液 (A 液): 0.1M 柠檬酸 24.3ml; 0.2M 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 25.7ml; 50ml 双蒸水, 30%过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50ul。

(2) 配制 TMB 溶液 (B 液): 25mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶于 4ml 二甲基亚砜中, 再加入 96ml 50mmol/L Ph2.4 柠檬酸。

用时取等体积 A, B 底物液混均。

在采用上述方法, 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, 扩大了检测的应用范围, 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, 即有重要的理论价值, 又有广泛的实际应用意义。

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）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) 配置 Ph9.6, 50mMol/l 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，放 4℃ 保存。

(3) 配置 Ph7.4 的磷酸盐缓冲液为洗板液（PBST）：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；加双蒸水 1000ml；加吐温（Tween）20；0.5ml（加量要准），放 4℃ 保存。

(4) 封板液配制，采用灭活正常兔血清，将正常兔血清放 62℃ 20 分钟，加入 0.05M 固体 Tris，0.15M 氯化钠（NaCl）及 2M 氯化氢（HCl），将 Ph 调至 8.0，制成封板液备用。

(5) 配置 50mMol/l Ph7.4 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；牛血清白蛋白（BSA）2g 及 9g 氯化钠（NaCl），加双蒸水至 1000ml；放 4℃ 保存。

(6) 羊抗鼠 IgG 的制备：首称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出羊抗鼠 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 0.2ml 新鲜配制的 0.1m 过碘酸钠（ $\text{NaIO}_4$ ）加到 HRP 中，室温搅拌 20 分钟



醛化 HRP 液对 Ph4.4, 1mM 乙酸盐缓冲液透析 4℃过夜, 或 30 分钟换一次水透析 4 小时

↓

用 20ul 0.2M Ph9.5 碳酸盐缓冲液将醛化 HRP 调到 Ph9—9.5, 之后立即加入 1ml 0.01M Ph9.5 含 5mg 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 0.1ml, 4mg/ml 新鲜配制的硼氢化钠溶液 4℃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) 底物液配制

A 液: (Ph5.0 柠檬酸—磷酸缓冲液) 0.1M 柠檬酸 24.3ml; 0.2M 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 25.7ml; 50ml 双蒸水; 30%过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50ul。

B 液 (TMB 溶液): 25mg3'3'5'5'四甲基联苯胺溶于 4ml 二甲基亚砜中再加入 96ml 150mmol/L Ph2.4 柠檬酸。

用时取等体积 A、B 底物液混均。

(9) 终止液: 2N 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

项目	全膝置换组	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	术前	术后半年	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	0.74±	1.306±	1.193±
OD450	0.162	0.55	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, 灵敏度及特异性, 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="#">CN1289924A</a>	公开(公告)日	2001-04-04
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	赵丹惠 李成文 张艳 姚力		
发明人	赵丹惠 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	CN1117986C		
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,对关节炎患者或动物的血清进行II型胶原吸光度的测定,通光多组测定值与正常值进行比较,就可得出II型胶原含量的半定量结果,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。