



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102360016 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 22

(21) 申请号 201110204803. 5

(22) 申请日 2011. 07. 21

(71) 申请人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市新模范马路 5 号
南京工业大学

(72) 发明人 林远 谢冉 张晓军 王月华

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

流式微球法对 SLE 的 Sm-RNP 抗体检测试剂盒的制备

(57) 摘要

本发明涉及一种基于流式微球载体技术的 Sm-RNP 抗体检验试剂盒及其制备和检测方法,属于免疫分析医学诊断技术领域。具体包括用 Sm-RNP 重组抗原包被高聚分子微球,用牛血清白蛋白封闭空白结合点,制成特异性 Sm-RNP 抗体探针-高聚分子微球;与待测标本共培养捕获 Sm-RNP 抗体,洗涤离心除去未结合的 Sm-RNP 抗体,再加入荧光标记的抗人 IgG 抗体;使用流式细胞仪检测微球的荧光强度,对待测抗体进行定性以及灵敏度和特异度分析。本方法具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点,并可对标本进行微量分析。

1. 一种基于流式微球载体技术的 Sm-RNP 抗体检验试剂盒,其特征在於试剂盒的组分有重组 Sm-RNP 抗原包被的微球载体,阴性对照血清,阳性对照血清,荧光标记抗体和浓缩样本稀释液。

2. 权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於微球载体是一种高聚分子微球,材质是乳胶、硅、树脂,或可塑性聚合材料,直径 2-20 微米,并且以共价键偶联重组 Sm-RNP 抗原。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於荧光标记抗体是荧光标记的羊、兔、鼠抗人免疫球蛋白中的一种或是几种。

4. 一种基于流式微球载体技术的 Sm-RNP 抗体检验试剂盒的制备方法,其特征在於:

1) 微球载体的制备:重组 Sm-RNP 抗原与活化的高聚分子微球按比例混合,4℃温育 4 小时以上,用 PBS 缓冲液洗涤、离心、弃上清液,加入一定浓度的牛血清白蛋白封闭液,温育 30 分钟,完成流式微球载体的制备;

2) 其它组分的制备:阴性对照血清是健康人的血清,阳性对照血清为经确诊的 Sm-RNP 抗体阳性血清,荧光标记抗体为羊、兔和鼠抗人免疫球蛋白抗体,样本稀释液中含有 PBS、小牛血清白蛋白、叠氮钠。

5. 一种基于流式微球载体技术的 Sm-RNP 抗体检验试剂盒的检测,其特征在於借助流式细胞仪检测对 Sm-RNP 抗体定性检验,以及灵敏度与特异度检测。

6. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在於定性检测是用阴性、阳性对照血清为参照,根据待测样品的荧光强度来定性,强度大于或等于阴性检测值的 2.1 倍时为阳性,小于时为阴性。

7. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在於采用四线表格法计算 Sm-RNP 抗体的灵敏度和特异度。

8. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在於所述各项检测借助流式细胞仪。

流式微球法对 SLE 的 Sm-RNP 抗体检测试剂盒的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及一种流式微球法 Sm-RNP 抗体检测试剂盒的制备和应用,属于医学免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种以大量自身抗体形成为特征,导致多系统、多器官损害的慢性系统性自身免疫性疾病。SLE 是一种常见的风湿性疾病,发病率为 1/1000,好发于育龄女性,男女之比约为 1 : 7 ~ 10,非生育年龄女性优势不明显。主要病因可能与遗传、环境因素和雌激素有关,已有研究报道年龄是一大危险因素,尤其以青年女性发病最为常见。发病机制主要与免疫调节异常、大量的自身抗体以及免疫复合物的形成有关,目前,具体的发病机制目前尚不清楚。

[0003] SLE 血清学检查是 SLE 普查和辅助诊断的重要方法。目前,医院实验室内初步诊断患者的血清学方法主要为酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测患者抗核抗体谱。ELISA 法为确诊试验,特异性高,但是灵敏度低、操作繁琐、不适于批量标本检测。研究新的快速、简便、敏感且特异的诊断方法,对 SLE 早期发现与治疗有重要意义。

[0004] 流式细胞学检测具有传统细胞学检测方法不可替代的技术优势。近年来在该技术基础上发展起来的流式微球载体技术,越来越多的应用于生物分子学检测,包括蛋白质、多肽和核糖核酸。流式微球载体技术是在高聚分子微球作为载体,在其表面进行免疫吸附反应,通过流式细胞仪测量示踪物的荧光强度,具有高灵敏度、特异性和稳定性的优点。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供一种基于流式微球载体技术的 Sm-RNP 抗体检测试剂盒的检测,借助流式细胞仪检测对 SLE 患者的 Sm-RNP 抗体定性检验以及灵敏度与特异度检测。

[0006] 技术方案:为解决上述技术问题,本发明的思路是使用荧光标记区分不同抗体的方法与使用抗体标记特异性识别蛋白的方法组合,达到用流式细胞仪进行定性和定量分析的目的。

[0007] 流式微球法 Sm-RNP 抗体检测试剂盒包括:Sm-RNP 抗原包被的微球载体、质控血清、荧光标记抗体和样本稀释液。

[0008] 流式微球法 Sm-RNP 抗体检测试剂盒的制备方法如下:

[0009] 1、微球载体:将重组 Sm-RNP 抗原与活化的高聚分子微球按规定比例混合,2-8℃ 孵育 4 小时;用 PBS 缓冲液洗涤离心 (3500rpm) 3 次后,弃上清液保留沉淀物;加入 1% 的牛血清白蛋白封闭,孵育 30 分钟,加 PBS 和防腐剂至适当浓度,4℃ 保存。

[0010] 2、质控血清:阴性对照血清是经国家标准品或国家标准品标定的参考品测定为 Sm-RNP 抗体阴性的血清,阳性对照血清是经国家标准品或国家标准品标定的参考品测定为

Sm-RNP 抗体阳性的血清。

[0011] 3、荧光标记抗人抗体：荧光标记抗人抗体为 FITC 标记的羊或兔抗人抗体。

[0012] 4、样本稀释液为含有 1% 小牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲液 (PBS)。

[0013] 流式微球法 Sm-RNP 抗体检测试剂盒的检测方法如下：

[0014] 1、定性检测是用阴性、阳性对照血清为参照，根据待测样品的荧光强度判断得病与否，强度大于或等于阴性检测值的 2.1 倍时为阳性，小于时为阴性。

[0015] 2、灵敏度与特异度检测，采用四线表格进行计算。

[0016] 上述所有检测均借助流式细胞仪。

[0017] 有益效果：本发明所述的流式微球法 Sm-RNP 抗体检测法具有以下优点：

[0018] 1、与传统 ELISA 法相比，显著提高了检测灵敏度。

[0019] 2、使 SLE 患者的血清学检测和其它疾病血清学检测同步进行，形成高通量分析。

[0020] 3、降低检测成本，减少分次检测带来的系统误差。

附图说明：

[0021] 图 1 为 FCMA 检测血清 Sm-RNP 抗体的阴性阳性对照。

具体实施方式：

[0022] 实施例 1：对 SLE 患者的 Sm-RNP 抗体定性检测。

[0023] SLE 血清标本 0℃ 待用；设定空白对照管（只加微球载体）、0 标准管（加微球载体和标记抗体）、阴性对照管（加阴性对照血清）、阳性对照管（加阳性对照血清）和若干待测样本管（加待测样本）；给所有管加样本稀释液 90 μl，微球载体 10 μl。给阴性对照管和阳性对照管分别加阴性和阳性对照血清 2 μl (1 : 50 稀释)，给待测样本管加待测血清 2 μl (1 : 50 稀释)，4℃ 培养 30min。给以上各管加磷酸缓冲液 4 毫升，离心 (3000r/min, 5min) 2 次，倒弃上清液。给以上各管（除空白对照管）加羊抗人 IgG-FITC 10 μl，4℃ 培养 30min。离心一次。给各管加 PBS 0.5ml，上流式细胞仪检测。临界值 (cut-off 值) 计算：临界值 = 阴性对照荧光强度值 × 2.1。测定样本荧光强度值 ≥ 临界值，anti-Sm-RNP 抗体抗体阳性；测定样本荧光强度值 < 临界值时，anti-Sm-RNP 抗体阴性，见图 1。检测后 SLE 患者 Sm-RNP 抗体阳性率 77%。

[0024] 实施例 2：对 SLE 患者的 Sm-RNP 抗体灵敏度与特异度检测。

[0025] SLE 血清标本 0℃ 待用；设定空白对照管（只加微球载体）、0 标准管（加微球载体和标记抗体）、阴性对照管（加阴性对照血清）、阳性对照管（加阳性对照血清）和若干待测样本管（加待测样本）；给所有管加样本稀释液 90 μl，微球载体 10 μl。给阴性对照管和阳性对照管分别加阴性和阳性对照血清 2 μl (1 : 50 稀释)，给待测样本管加待测血清 2 μl (1 : 50 稀释)，4℃ 培养 30min。给以上各管加磷酸缓冲液 4 毫升，离心 (3000r/min, 5min) 2 次，倒弃上清液。给以上各管（除空白对照管）加羊抗人 IgG-FITC 10 μl，4℃ 培养 30min。离心一次。给各管加 PBS 0.5ml，上流式细胞仪检测。采用四线表格，见表 1，计算 Sm-RNP 抗体灵敏度为 78.6%，特异度为 73.0%。

[0026] 表 1. FCMA 检测血清 Sm-RNP-IgG 抗体状态与检测结果分布图

		样品的实际状态			
		+	-		
[0027]	检测结果	+	66	38	104
		-	18	103	121
			84	141	

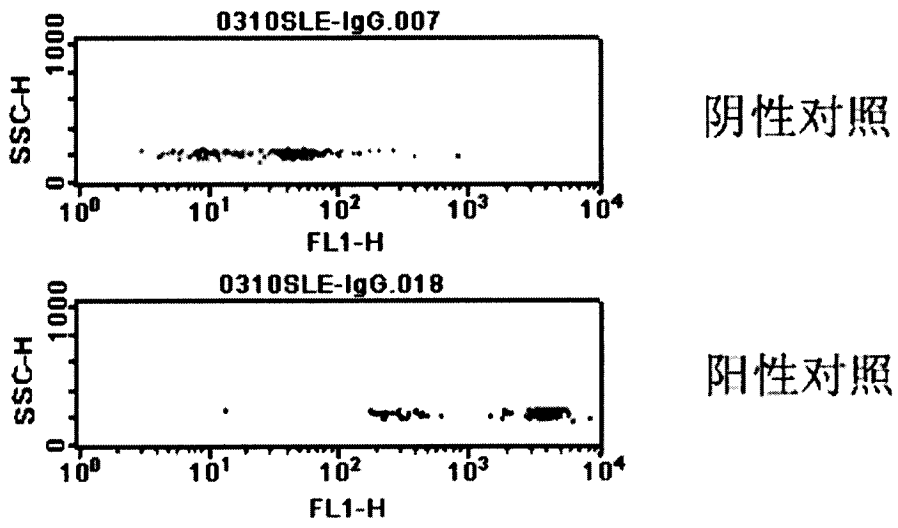


图 1

专利名称(译)	流式微球法对SLE的Sm-RNP抗体检测试剂盒的制备		
公开(公告)号	CN102360016A	公开(公告)日	2012-02-22
申请号	CN201110204803.5	申请日	2011-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	林远 谢冉 张晓军 王月华		
发明人	林远 谢冉 张晓军 王月华		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/543 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于流式微球载体技术的Sm-RNP抗体检验试剂盒及其制备和检测方法，属于免疫分析医学诊断技术领域。具体包括用Sm-RNP重组抗原包被高聚分子微球，用牛血清白蛋白封闭空白结合点，制成特异性Sm-RNP抗体探针-高聚分子微球；与待测标本共培养捕获Sm-RNP抗体，洗涤离心除去未结合的Sm-RNP抗体，再加入荧光标记的抗人IgG抗体；使用流式细胞仪检测微球的荧光强度，对待测抗体进行定性以及灵敏度和特异度分析。本方法具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点，并可对标本进行微量分析。

	样品的实际状态			
	+	-		
检测结果	+	66	38	104
	-	18	103	121
		84	141	