

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610078015.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月31日

[11] 公开号 CN 101063680A

[22] 申请日 2006.4.29

[21] 申请号 200610078015.5

[71] 申请人 北京华大吉比爱生物技术有限公司

地址 101300 北京市顺义区空港科技创业园
B-6号

共同申请人 北京华大基因研究中心 汪建
杨玲牟峰

[72] 发明人 汪建 杨玲 牟峰 张伟
陈久龙 郝志波 姜范波 何静云
陈唯军 沈东艳 许东光 顾志鹏
沈远 苏慧玲 李黎 万戈江
方健秋 文洁

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 程泳

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

[54] 发明名称

检测自身免疫疾病相关抗体谱的微阵列-酶
联免疫检测试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种抗可提取性核抗原(ENA)抗体
谱微阵列(Array)-酶联免疫(ELISA)检测试剂盒,
特别是用于检测选自系统性红斑狼疮(SLE),混合
性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性
硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮肌炎(PM/DM)和类
风湿性关节炎(RA)的系统性自身免疫疾病之特征性
抗体的ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒。

1. 一种ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒，其特征在于包括1)同时固定有多种蛋白质基底，以及任选的，2)用于通过ELISA方法检测待测样品中是否存在能够与固定在酶标板基底上的蛋白质发生抗原-抗体反应的物质之反应剂和检测剂。

2. 权利要求1的试剂盒，其中所述固定蛋白质的基底为选自聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯的ELISA酶标板。

3. 权利要求1的试剂盒，其用于检测选自包括系统性红斑狼疮(SLE)，混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮炎(PM / DM)和类风湿性关节炎(RA)的系统性自身免疫疾病之特征性抗体的多种蛋白质，其中所述多种蛋白质为针对选自如下的抗体之抗原：抗Smith抗体，抗RNP抗体（抗核糖核蛋白抗体），抗SSA抗体(抗干燥综合征抗原A抗体)，抗SSB抗体(抗干燥综合征抗原B抗体)，抗Scl-70抗体，抗Jo-1抗体和抗Rib-P抗体（抗核糖体P蛋白抗体）。

4. 权利要求1的试剂盒，其中所述固定在基底上的针对所述特征性抗体之抗原的种类为至少 2^n 种， n 为大于等于1的整数。

5. 一种在权利要求1所述ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒中的基底上固定用于检测特异性抗体的抗原的方法，包括：

将所述特异性抗原点样于基底上，4℃包被16-24个小时；

用含0.05-0.5%Tween20，1-5%BSA，5-10%的脱脂奶粉，5-10%的蔗糖之0.01-0.1M的磷酸盐缓冲液或者Tris缓冲液，37℃封闭0.5-3小时；

用含有0.05-0.5%Tween20，0.1-1%NaCl的0.01-0.1M的磷酸盐缓

冲液洗涤，晾干后，于 2-8℃保存备用。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述固定蛋白质的基底为选自聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯的 ELISA 酶标板。

检测自身免疫疾病相关抗体谱的微阵列-酶联免疫检测试剂盒

发明领域

本发明涉及一种抗可提取性核抗原(ENA)抗体谱微阵列(Array)-酶联免疫(ELISA)检测试剂盒,特别是用于检测选自系统性红斑狼疮(SLE)、混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮炎(PM/DM)、和类风湿性关节炎(RA)的系统性自身免疫疾病之特征性抗体的ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒。

发明背景

系统性自身免疫性疾病指风湿病中属于弥漫性结缔组织的一类疾病,主要包括系统性红斑狼疮(SLE)、混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮炎(PM/DM)和类风湿性关节炎(RA)等。

根据目前病理学和临床医学的发展水平,上述系统性自身免疫性疾病普遍存在着发病原因不明、病情严重、诊断困难等共同特征,迫切需要提供有效的诊断方法,以便及时治疗。

已知自身抗体是系统性自身免疫性疾病的重要标志。每种系统性自身免疫性疾病都伴有特征性的自身抗体谱。病人血液中存在高效价自身抗体是系统性自身免疫性疾病的特点之一,也是临床确诊系统性自身免疫性疾病的重要标志之一。自身抗体检测在诊断系统性自身免疫性疾病、判断疾病的活动程度、观察治疗效果、指导临床用药及预后评估等具有重要的临床意义。随着对自身抗体的了解越来越深入,临床应用越来越广泛,免疫学技术进一步提高,自身抗体检测已是临床免疫检测的一项重要的实验室指标。

目前临床上常用的对获自患者的样品进行自身抗体的检测的方法主要包括：自身抗体检测方法有免疫双扩散法（Double Immunodiffusion Assay, DID）、间接免疫荧光法（Indirect Immunofluorescence Assay, IIF）、免疫印迹法（Western Blot, WB）和酶联免疫吸附法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）等。

免疫双扩散法（DID）是经典的实验方法。其不用很多的特殊仪器，价格低廉，特异性高。但其操作费时费力，需要用肉眼来观察沉淀环，结果灵敏度低，判断不客观，对实验室技术人员的技术水平和经验要求较高，不同操作人员甚至是同一操作人员不同次操作结果的一致性较差。

间接免疫荧光分析法（IIF）是检测自身抗体的常用技术。其实验基质为 HEp-2 细胞或不同灵长类肝脏组织冰冻切片，含有完整的抗原谱。许多组织经 IIF 着染可提示自身抗体的存在，但是不能对自身抗体的种类进行具体客观的评价，因此其特异性的证实需要其它技术如免疫印迹法、ELISA 等进行二级确认试验。并且对 IIF 着染的鉴定有一定的主观性，因而对结果的解释可能在不同工作日之间、不同观察者之间、新老组织切片之间而有所不同，对实验室技术人员的技术水平和经验要求较高，同时对实验室的专用设备荧光显微镜也有较高要求，各实验室在这些要求上很难达到统一，并且它使得各实验室之间的结果一致性较差。

免疫印迹法（WB）是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的一种免疫生化技术，具有 SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性的优点。但是在 SDS-PAGE 的过程中，许多抗原决定簇的构象可能遭到破坏，不能与特异性抗体发生反应或者发生非特异结合，造成结果判断错误。最近欧蒙（德国）医学实验诊断股份公司的一项研究发现仅可用天然的 SSA 检测抗 SSA 抗体。另外患者的样品中往往含有多种抗可提取性核抗原的抗体，能同时与 ENA 试剂反应出现多条沉淀线，肉眼观察结果不客观。

酶联免疫吸附法（ELISA）具有成熟度高，灵敏度高、特异性较好，操作方法简便快速、无放射性污染且检测结果排除了人为的主观判断，以及应用范围广等很多优点，但一次试验只能检测单一指标，通量低，检测成本较高，在自身免疫疾病的诊断应用推广方面存在着极大的局限性。

此外，免疫诊断蛋白芯片尽管能同时检测多项指标，但由于它是把抗原包被在用于制备蛋白质芯片的基底-玻片或膜上，并且玻片在点样前要经过醛基化或多聚赖氨酸等预处理，导致生产成本增加，以及后续实验的操作繁琐，重复性差，市场推广性不强。

为了克服上述检测系统性自身免疫疾病的现有方法中的缺点，节省时间和人力和物力，本发明人开发了一种工艺简单，定位准确，反应快速，价格低廉，能进行多项蛋白检测的 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒，及其制备方法。

利用 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒检测系统性自身免疫性疾病，成功克服了现有检测试剂盒操作繁琐、检测指标单一、检测成本高等缺陷，具有廉价、简单、快速、准确、多重检测等优点。

发明内容

本发明人所开发的 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒将现代微阵列技术与传统的 ELISA 技术相融合，在例如 96 孔酶标板的基底上利用全自动点样仪有序固定多种蛋白质，实现了对样品中目的蛋白质的检测，可用于生物学、医学及其相关领域中目的蛋白质的鉴定和疾病标志性蛋白质的鉴别。具体的，所述试剂盒基于芯片技术的核心原理，集成酶联免疫吸附试验（ELISA）的高成熟度而成的新一代检测技术体系。在保持了 ELISA 方法学的成熟、方便，敏感性和特异性都较为良好的基础，又具有芯片技术的高通量、低成本、高平行、微型化等特点

因此，本发明的一方面涉及一种 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒，其特征在于包括 1) 同时固定有多种蛋白质的基底，以及任选

的, 2) 用于通过ELISA方法检测待测样品中是否存在能够与固定在酶标板基底上的蛋白质发生抗原-抗体反应的物质之反应剂和检测剂。

本领域普通技术人员知晓, 所述用于固定蛋白质的基底可以为选自聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯材料的用于ELISA实验的酶标板。事实上, 所述基底可以为适用于ELISA反应的任一材料, 只要所选材料对于所要固定的蛋白质是惰性的, 不影响待固定的蛋白质用于检测样品中相关物质的性质。

在本发明的又一方面, 涉及一种用于检测选自包括系统性红斑狼疮(SLE)、混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮肌炎(PM / DM)、和类风湿性关节炎(RA)的系统性自身免疫疾病的ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒, 其中包括1) 同时固定有针对选自如下特征性抗体的之抗原的酶标板基底: 抗Smith抗体、抗RNP抗体(抗核糖核蛋白抗体)、抗SSA抗体(抗干燥综合征抗原A抗体)、抗SSB抗体(抗干燥综合征抗原B抗体)、抗Scl-70抗体、抗Jo-1抗体和抗Rib-P抗体(抗核糖体P蛋白抗体), 以及任选的, 2) 用于通过ELISA方法检测待测样品中是否存在能够与固定在酶标板基底上的蛋白质发生反应的物质之反应剂和发光液。

在本发明的一个实施方案中, 所述固定在基底, 例如用于ELISA反应的酶标板上的针对所述特征性抗体之抗原的种类为至少 2^n 种, n 为大于等于1的整数, 例如 $n=1, 2, 3, 4, 5$ 或 6 。相应的, 固定于基底上的抗原种类可以为2种, 3种, 4种, 5种, 6种, 7种, 8种, 9种, 10种, 11种, 12种, 13种, 14种, 15种, 16种, 32种或64等等。

采用本发明所述ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒与传统的ELISA试剂盒相比, 具有如下优势: 后者在一次检测中所测得指标数有限, 样本数量仅为一个; 而前者在每个反应孔中可以一次性完成多个指标的检测, 做到了多样本多指标并行检测, 并且操作简单, 大大提高工作效率, 节约成本。

不仅如此, 采用本发明所述ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试

试剂盒与现有的蛋白芯片相比，其优势在于：后者把蛋白固定在玻璃片或者膜上，使得实验操作要求高，过程繁琐，人为因素产生的操作误差大，而前者的实验操作步骤与传统的 ELISA 几乎相同，因此更适合用于临床检测。

因此，本发明所述 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒是在传统的 ELISA 的基础上，成功地融和了 ELISA 技术和微阵列技术二者的优点，形成的一种操作简单，检测快速、准确，具有多重分析能力的实验技术。

具体的，本发明采用以下步骤制备所述 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒，以及利用所述试剂盒，针对 7 种不同自身免疫疾病的特征性抗体加以检测。

ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫方法是在传统的 96 孔酶标板上固定特异性的抗原分子。在本发明的一个实施方案中，所述试剂盒在基底，例如用于 ELISA 反应的酶标板上固定有由如下抗原分子组成的用于同时检测 7 种不同自身免疫疾病的抗原：Sm、RNP、SSA、SSB、Scl-70、Jo-1 和 rRNP 特异性抗原，和阳性对照人 IgG。

在本发明的一个实施方案中，所述抗原的固定采用如下方法，1) 将 0.1-10 ng 特异性抗原的磷酸盐缓冲液点样于传统的 96 孔可拆卸酶标板条孔内，4℃ 包被 16-24 个小时；

2) 用含 0.05-0.5% Tween20, 1-5% BSA, 5-10% 的脱脂奶粉, 5-10% 的蔗糖之 0.01-0.1M 的磷酸盐缓冲液或者 Tris 缓冲液, 37℃ 封闭 0.5-3 小时；以及

3) 用含有 0.05-0.5% Tween20, 0.1-1% NaCl 的 0.01-0.1M 的磷酸盐缓冲液洗涤，晾干后，于 2-8℃ 保存备用。

附图说明

图 1 为本发明所述 ENA 抗体谱微阵列-酶联免疫检测反应的实验原理。

图 2 为本发明所述酶标板的点样示意图。

图 3 为本发明所述酶标板的检测结果。

下面，结合附图和实施例进一步说明本发明。

实施例1

用于系统性自身免疫疾病检测的ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒中固定多种蛋白质抗原的酶标板的制备

为了检测样品中是否含有选自包括系统性红斑狼疮(SLE)、混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮肌炎(PM / DM)和类风湿性关节炎(RA)的系统性自身免疫疾病的特征性抗体，制备固定有针对选自如下特征性抗体之抗原的酶标板：抗Smith抗体、抗RNP抗体（抗核糖核蛋白抗体）、抗SSA抗体(抗干燥综合征抗原A抗体)、抗SSB抗体(抗干燥综合征抗原B抗体)、抗Scl-70抗体、抗Jo-1抗体和抗Rib-P抗体（抗核糖体P蛋白抗体）。

1. 抗原的制备

所述针对特征性抗体:抗 Smith 抗体，抗 RNP 抗体（抗核糖核蛋白抗体），抗 SSA 抗体(抗干燥综合征抗原 A 抗体)，抗 SSB 抗体(抗干燥综合征抗原 B 抗体)，抗 Scl-70 抗体，抗 Jo-1 抗体和抗 Rib-P 抗体（抗核糖 P 蛋白抗体）的抗原均商购自 Immunovision.Inc，（产品名称和产品号分别为：SCL-3000, 3785； JO1-3000, 3540； SSA-3000, 4237； SSB-3000, 3307； SMA-3000, 4109； SRC-3000, 4018； 和 PAG-3000, 3776）。

采用购自 Greiner 公司的 8 孔板条 [产品号 04300143]，使用如下包被缓冲液（磷酸二氢钠 0.2965 g，磷酸氢二钠 2.9g，氯化钠 4g，纯化水加至 1000 ml）。发光液购买自 Pierce 公司 [产品号 37075]

2. 点样:

将 4-100 nl 的含有 0.1-10 ng 的上述相关疾病特异性抗原的

0.01-0.1M的磷酸盐缓冲液用全自动点样仪点样于Greiner公司的8孔板条的孔内，4℃包被16-24个小时。具体的，Array-ELISA点阵示意图如图2所示，其中用于点样的阵列形式不局限于所表示的形式，可以任意组合。

3. 封闭:

用50-200 μ l的含0.05-0.5%Tween20, 1-5%BSA, 5-10%的脱脂奶粉, 5-10%的蔗糖的0.01-0.1M的磷酸盐缓冲液或者Tris缓冲液(磷酸氢二钠 5.8g, 磷酸二氢钠 0.593g, 氯化钠8.0g, Casein 2.5g, 硫柳汞钠0.5g, 蔗糖(HCV\TP) 50.0g, 蔗糖(HIV\HBV) 100.0g, 山羊血清 100ml, 明胶 10ml), 37℃封闭0.5-3小时, 用含有经20倍稀释的浓缩洗液(氯化钾4.0g, 磷酸二氢钾 4.0g, 磷酸氢二钠 58.0g, 氯化钠 160.0g, 硫柳汞钠 0.1g, Tween-20 50ml, 加纯化水至1000ml)洗涤。晾干后, 于2-8℃保存备用。

实施例2 采用自身免疫疾病检测的ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒的测定

1. 加样

将用样品稀释液(磷酸氢二钠 2.9g, 磷酸二氢钠 0.2965g, 氯化钠10g, Casein2.5g, 氨基吡啉5g, 小牛血清 100ml, 甘油 75ml, Tween-20 5 ml, 曲拉通-100 5ml, ProClin300 0.15ml, 纯化水加至 1000ml)按照1:50稀释好的待测样本50 μ l加入如上述实施例1所制备的酶标板的各个反应孔中, 放入孵育振荡器, 3档37℃反应60分钟。

2. 洗板:

样本反应结束后, 把反应板从振荡器中拿出来, 放入洗板机的相应位置, 调节“条数”按键至相应条数, 调节“次数”按键至5次, 洗板机洗板时无浸泡, 无振荡, 无间歇。洗板结束后, 用吸水纸把板拍干。

3. 加入酶标二抗:

向每孔加入1/20000 RP (商购自pierce公司) 标记的兔抗人IgG的抗体 (商购自北京华大吉比爱生物技术有限公司) 50ul, 放入孵育振荡器, 3档37℃反应60分钟。反应结束后洗板。

4. 检测:

每孔加入配制好的 (A:B=1:1) 发光液 (商购自pierce公司) 30ul, 室温下30秒成像。拍摄时采用低温CCD, 在稳定的低温下放入相配套的扫描仪中, 用焦距(mm) 25; 光圈1.4-16的Fujinon HF 25HA-1B镜头拍摄图片, 读取数据。结果如图3所示

实施例3

ENA抗体谱微阵列-酶联免疫检测试剂盒与现有技术的比较

采用上述实施例1-3所述的方法, 对获自北京市协和医院的样品进行检测。与目前常用的检测方法加以比较, 结果如下。

检测指标	欧蒙 ELISA 阳性		欧蒙印迹 或欧蒙 ELISA 阴性		阳性符合率	阴性符合率	总符合率
	Array-ELISA 阳性	Array-ELISA 阴性	Array-ELISA 阳性	Array-ELISA 阴性			
Sm	150	0	0	300	100.0%	100.0%	100.0%
RNP	298	2	1	299	99.3%	99.7%	99.5%
SSA	300	0	2	298	100.0%	99.3%	99.7%
SSB	200	0	1	299	100.0%	99.7%	99.8%
Scl-70	50	0	1	299	100.0%	99.7%	99.7%
Jo-1	30	0	0	300	100.0%	100.0%	100.0%
RRNP	70	0	0	300	100.0%	100.0%	100.0%

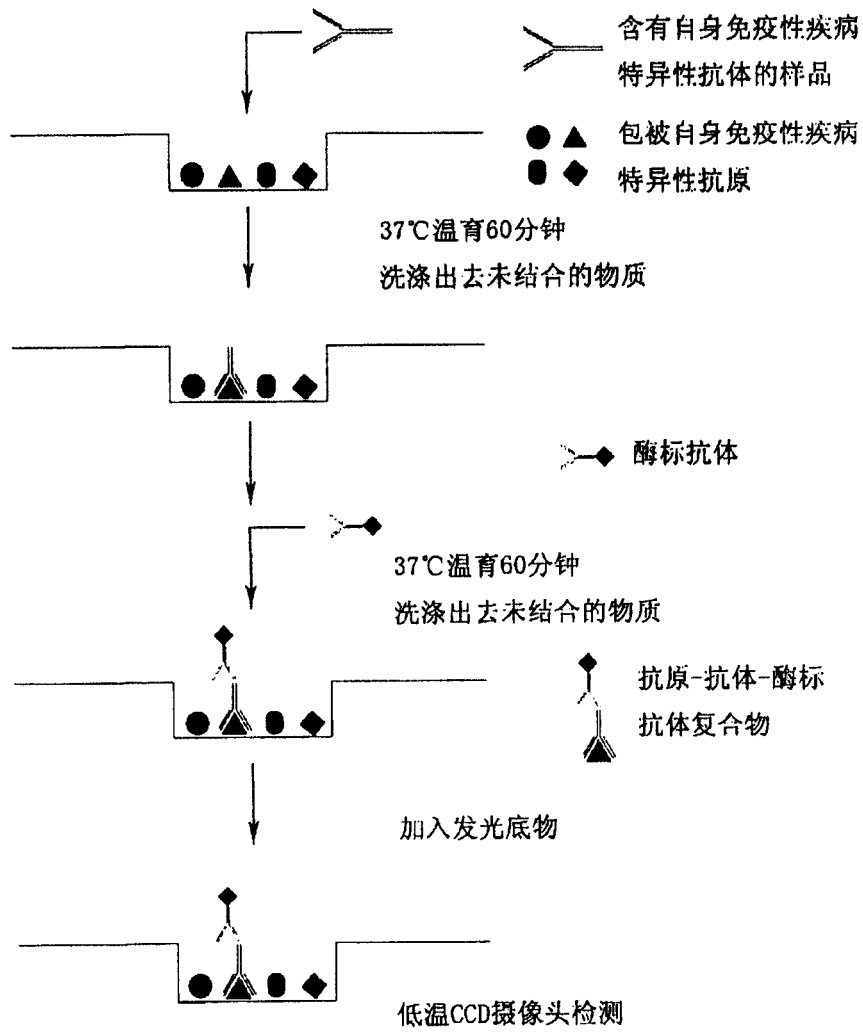


图 1

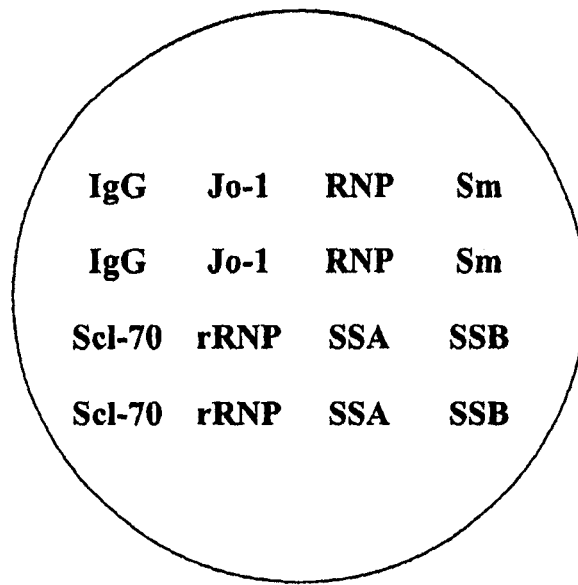


图 2

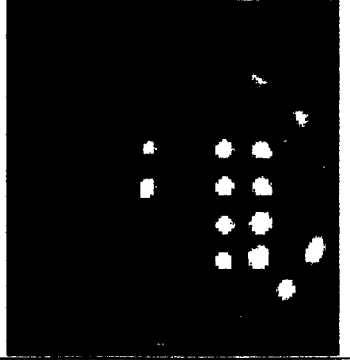
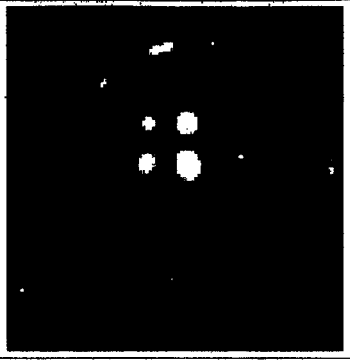
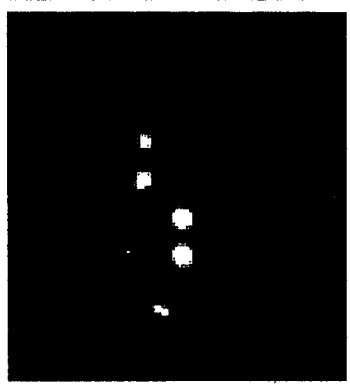
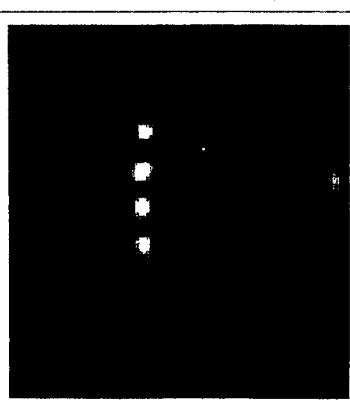
	<p>Sm、RNP、SSA、SSB均阳性</p>
	<p>Jo-1阳性</p>
	<p>rRNP阳性</p>
	<p>Scl-70阳性</p>

图 3

专利名称(译)	检测自身免疫疾病相关抗体谱的微阵列 - 酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101063680A	公开(公告)日	2007-10-31
申请号	CN200610078015.5	申请日	2006-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京华大吉比爱生物技术有限公司 北京华大基因研究中心 汪建 杨玲 牟峰		
申请(专利权)人(译)	北京华大吉比爱生物技术有限公司 北京华大基因研究中心 汪建 杨玲 牟峰		
当前申请(专利权)人(译)	北京华大吉比爱生物技术有限公司 北京华大基因研究中心 汪建 杨玲 牟峰		
[标]发明人	汪建 杨玲 牟峰 张伟 陈久龙 郝志波 姜范波 何静云 陈唯军 沈东艳 许东光 顾志鹏 沈远 苏慧玲 李黎 万戈江 方健秋 文洁		
发明人	汪建 杨玲 牟峰 张伟 陈久龙 郝志波 姜范波 何静云 陈唯军 沈东艳 许东光 顾志鹏		

沈远
苏慧玲
李黎
万戈江
方健秋
文洁

IPC分类号 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/535

代理人(译) 程泳

外部链接 [Espacenet](#) [SIPO](#)

摘要(译)

本发明涉及一种抗可提取性核抗原(ENA)抗体谱微阵列(Array) - 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒，特别是用于检测选自系统性红斑狼疮(SLE)，混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合症(SS)、系统性硬皮病(PSS)、多发性肌炎或皮肌炎(PM/DM)和类风湿性关节炎(RA)的系统性自身免疫疾病之特征性抗体的ENA抗体谱微阵列 - 酶联免疫检测试剂盒。

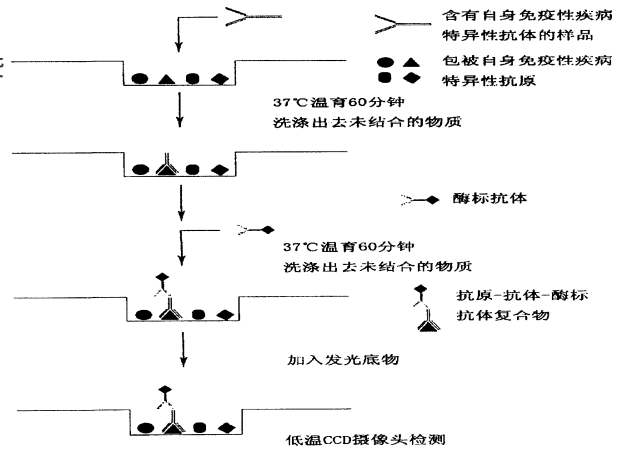


图 1