



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103308674 B

(45)授权公告日 2018.04.06

(21)申请号 201310179764.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2013.05.15

G01N 33/53(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/573(2006.01)

申请公布号 CN 103308674 A

G01N 33/577(2006.01)

(43)申请公布日 2013.09.18

审查员 许珊萍

(66)本国优先权数据

201210560448.X 2012.12.20 CN

(73)专利权人 周继蓉

地址 402460 重庆市荣昌区昌元镇后西二街1幢1单元3-1

专利权人 重庆联佰博超医疗器械有限公司

(72)发明人 张大 文李玲

(74)专利代理机构 北京元本知识产权代理事务所 11308

代理人 兰渝宏

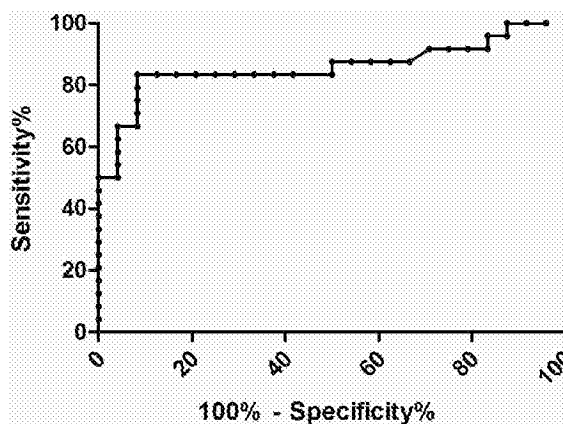
权利要求书1页 说明书23页
序列表5页 附图5页

(54)发明名称

过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物及其应用

(57)摘要

本发明涉及医学领域,具体证实了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在及可作为类风湿关节炎的诊断标志物,其捕获剂可以作为类风湿关节炎的诊断试剂;本发明还介绍了用于检测权利要求所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的诊断试剂盒,所述诊断试剂盒的固相载体上包被有所述循环免疫复合物的捕获剂,所述诊断试剂盒还含有同所述捕获剂结合并可作为定量的检测试剂;本发明首次证实了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在;本发明建立了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的含量检测方法,其可以精准的检测患者血清中的循环免疫复合物含量,重复性好;过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物其在类风湿关节炎中的诊断能力高于RF和anti-CCP;也可以作为其它几种疾病的诊断标志物,且区分度高。



1. 过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物在制备类风湿关节炎诊断标志物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物在制备类风湿关节炎早期诊断标志物中的应用。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,在制备类风湿关节炎的预示和/或活动度判断和/或治疗反应性诊断标志物中的应用。
4. 用于检测过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的诊断试剂盒,其特征在于:所述诊断试剂盒的固相载体上包被有循环免疫复合物的捕获剂,所述诊断试剂盒还含有检测试剂,所述检测试剂能结合免疫复合物并起到定量检测的作用。
5. 根据权利要求4所述的诊断试剂盒,其特征在于:所述捕获剂为补体C1q或补体C1q抗体、抗人IgG抗体、抗人IgM抗体或Fc γ R,所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体。
6. 根据权利要求5所述的诊断试剂盒,其特征在于:所述检测试剂为辣根过氧化物酶标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV抗体。
7. 根据权利要求4所述的诊断试剂盒,其特征在于:所述捕获剂为抗人过氧化物还原酶IV抗体,所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人IgG抗体、抗人IgM抗体。
8. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其特征在于:所述检测试剂为辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG抗体或羊抗人IgM抗体。
9. 过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的捕获剂在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述捕获剂包括补体C1q或补体C1q抗体、过氧化物还原酶IV的特异性抗体、抗人IgG抗体、抗人IgM抗体或Fc γ R。
11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在于:所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的捕获剂在制备类风湿关节炎早期诊断试剂中的应用。
12. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,在制备类风湿关节炎的预示和/或活动度判断和/或治疗反应性诊断试剂中的应用。

过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,特别涉及免疫复合物及其应用。

背景技术

[0002] 抗原-抗体复合物(antigen-antibody complex),根据全国科学技术名词审定委员会的定义,是指抗体与抗原借助静电力、氢键、范德华力等次级键可逆性结合而形成的多分子复合物。能激活补体、参与免疫调节、介导III型超敏反应。免疫复合物(immune complex; IC),是抗原-抗体复合物中的一种,根据全国科学技术名词审定委员会的定义,是指抗体与可溶性抗原结合而形成的复合物。抗体量足以交联抗原时形成大的免疫复合物,由网状内皮系统中表达Fc受体和补体受体的细胞所清除;抗原过量时则形成小的可溶性免疫复合物,沉积于小血管而造成小血管损伤。循环免疫复合物(circulating immunocomplex, CIC)是一类在抗原量稍过剩时,形成中等大小的可溶性免疫复合物(8.8~19S),它既不能被吞噬细胞清除,又不能通过肾小球滤孔排出、可较长时间游离于血液和其他体液中,当血管壁通透性增加时,此类IC可随血流沉积在某些部位的毛细血管壁或嵌合在肾小球基底膜上,激活补体导致ICD(免疫复合物沉积)的发生。检查组织内或循环IC的存在有助于某些疾病的诊断、发病机制的研究、预后估计、病情活动观察和疗效判断等。并不是所有的抗原-抗体复合物都具备循环免疫复合物的特性。寻找和疾病相关性强的循环免疫复合物对疾病的诊断意义重大。

[0003] 过氧化物还原酶(Peroxiredoxins Prx)是生物体内普遍存在的一个重要的具有抗氧化活性和调节信号转导的抗氧化蛋白,它对生物体具有保护作用。过氧化物还原酶IV是过氧化物还原酶家族中的一员,文献对过氧化物还原酶IV报道较少。申请号为201110025631.5的中国发明专利申请,介绍了过氧化物还原酶IV在制备类风湿关节炎早期诊断试剂中的应用,该专利申请指出了过氧化物还原酶IV作为类风湿关节炎的特异性抗原,并未证实类风湿关节炎当中存在过氧化物还原酶IV循环免疫复合物存在;公开号为W02010146064A1,申请号为PCT/EP2010/058414的专利申请,介绍了一种夹心ELISA试剂盒,其检测的对象为过氧化物还原酶IV,具体方法为:将过氧化物还原酶IV的特异性抗体作为捕获分子包被于固相中,最为第一抗体,与催化活性分子标记的第二抗体。用于检测待测样品中过氧化物还原酶IV的含量。并指出,该含量和类风湿关节炎、cardiac diseases(心脏病),sepsis(脓毒症),pancreatitis(胰腺炎),other gi tract deseases(除胰腺炎之外的其他消化疾病),breast CA(卵巢囊肿),coIon ca(结肠癌),pancreas ca(胰腺癌),diabetes(糖尿病),kidney disease(肾病),neurodegenerative disorders(神经退化性紊乱)有关。但是,该专利文献,仅揭示了过氧化物还原酶IV的表达量和上述疾病有关,以及其含量的检测方法,并未有提到其和免疫相关的任何信息;那么,过氧化物还原酶IV是否可以在类风湿关节炎患者中形成循环免疫复合物呢?目前尚无相关文献报道,而且仅有上述专利的结果是不能推导出类风湿关节炎患者血清中存在过氧化物还原酶IV循环免疫复合物的,因为在类风湿关节炎已知的数十种自身抗原(Wolfgang Hueber, Brian A. Kidd,

Beren H.Tomooka,Byung J.Lee,Bonnie Bruce, James F.Fries,Grete Sønderstrup, Paul Monach,Jan W.Drijfhout,Walther J.van Venrooij,Paul J.Utz,Mark C.Genovese,William H.Robinson.Antigen Microarray Profiling of Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis.ARTHRITIS&RHEUMATISM Vol.52,No.9,September2005, pp2645-2655) 当中,也只有少部分与其特异性抗体结合形成了循环免疫复合物。目前在类风湿关节炎已知抗原当中,只有类风湿因子(rheumatoid factor,RF) (Newkirk MM, Fournier MJ,Shiroky J:Rheumatoid factor avidity in patients with rheumatoid arthritis:identification of pathogenic RFs which correlate with disease parameters and with the gal glycoform of IgG.J Clin Immunol1995,15:250-257.)、II型胶原(collagen type II) (Steffen C,Ludwig H, Knapp W,Thumb N,Eberl R, Frank O,Freilinger H:Collagen antibodies and collagen-anticollagen immune complexes in rheumatoid arthritis.Z Rheumatol 1975,34:391-399.)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphate isomerase,GPI) (Korganow AS, Ji H,Mangialaio S,Duchateille V,PeIanda R,Martin T,Degott C, Kikutani H,Rajewsky K,Pasquali JL,Benoist C, Mathis D:From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins.Immunity 1999,10:451-461) 及瓜氨酸化修饰后的纤维蛋白原等(citrullinated fibrinogen) (Xiaoyan Zhao,Nwora Lance Okeke,Orr Sharpe, Franak M Batliwalla,Annette T Lee,Peggy P Ho,Beren H Tomooka,Peter K Gregersen and William H Robinson. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis.Arthritis Research & Therapy2008,10:R94) 在类风湿关节炎中有其循环免疫复合物存在。因而,我们认为,即便已知某一自身抗原,不经过充分的验证不能判断其是否能以免疫复合物的形式存在,而且从上述目前类风湿关节炎已知抗原及免疫复合物统计结果看,从某特定抗原验证出不存在免疫复合物的可能性远远大于存在免疫复合物的几率。

[0004] 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种以滑膜炎为基本病理改变,以慢性破坏性关节病变为特征的全身性自身免疫病;现有研究指出:类风湿性关节炎是由类风湿因子(rheumatoid factor,RF)与免疫球蛋白IgG结合形成的免疫复合物,沉积于关节骨膜、皮下组织等处引起类风湿关节炎等。

[0005] RF和抗环状瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-CCP)是临床上应用最多的RA检测指标。RF虽然有较高的敏感性,但特异性较低。anti-CCP是一类针对含有瓜氨酸化表位的自身抗体的总称,对RA的诊断具有很高的敏感性和特异性,分别达到80%到95%左右。即便如此,RF和anti-CCP仍不能完全满足RA的诊断。在RA患者当中,有近 20%的患者是RF和anti-CCP双阴性的,尤其是在早期RA患者当中,RF 和anti-CCP双阴性的患者接近30%。所以寻找敏感性特异性更高或能弥补 RF及anti-CCP双阴性空白的检测指标一直是RA临床诊断研究的重点课题!

[0006] 众所周知,RA的病理改变从滑膜组织开始逐渐向软骨到骨发展。RA在早期若未得到有效治疗,将会引起关节功能障碍甚至劳动力丧失,并导致全身多脏器受累进而危及生命。如果能尽早对RA病情做出诊断,及早治疗,从而阻止或延缓其发展,将能有效的提高RA的治疗效果并减少其并发症的发生。而针对 RA早期有高度敏感性和特异性的检测指标是

实现RA早期诊断和治疗的前提。虽然,过氧化物还原酶IV在RA早期诊断中的应用被申请号为201110025631.5的中国发明专利申请报道,但是,在此基础上,是否存在更佳的检测指标,以及根据该指标摸索多样化的检测方法,值得研究。

[0007] 本发明是在上述研究基础上展开的。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种存在于循环系统中的免疫复合物,该循环免疫复合物存在于类风湿关节炎患者的循环系统液体中。

[0009] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0010] 过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物。

[0011] 所述的循环免疫复合物,为过氧化物还原酶IV与其特异性抗体结合形成的复合物;或具有抗原性的过氧化物还原酶IV的截短片段与其特异性抗体结合形成的复合物。

[0012] 进一步,所述截短片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-8任一所示。

[0013] 进一步,所述的循环免疫复合物被补体C1q(Complement Component C1q)或补体C1q抗体(Complement Component C1q抗体)捕获,所述补体C1q至少含有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列。

[0014] 所述循环免疫复合物被能与过氧化物还原酶IV结合的物质捕获,和/或被能与过氧化物还原酶IV形成复合物的抗体IgG和/或IgM结合的物质捕获。

[0015] 进一步,所述循环免疫复合物被过氧化物还原酶IV的特异性抗体捕获。

[0016] 进一步,所述特异性抗体为小鼠抗人过氧化物还原酶IV抗体为捕获剂。

[0017] 进一步,所述循环免疫复合物被抗人IgG、IgM抗体捕获。

[0018] 进一步,所述抗人IgG、IgM抗体为羊抗人IgG、IgM抗体或小鼠抗人IgG、IgM抗体。

[0019] 进一步,所述循环免疫复合物被Fc γ R捕获。

[0020] 进一步,所述Fc γ R包括CD16、CD32或CD64。本发明中提及的捕获剂,主要是指抗原捕获剂,和/或抗体捕获剂。

[0021] 本发明的目的之二在于提供所述过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的新应用,该应用为众多疾病,尤其是类风湿关节炎疾病的诊断提供了新思路。

[0022] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0023] 所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物在制备类风湿关节炎诊断标志物中的应用。

[0024] 进一步,所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物在制备类风湿关节炎早期诊断标志物中的应用。

[0025] 进一步,在制备类风湿关节炎的预示和/或活动度判断和/或治疗反应性诊断标志物中的应用。

[0026] 所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物在制备骨关节炎、系统性红斑狼疮、皮炎、强直性脊柱炎、硬皮病、结节性多动脉炎、Wegener肉芽肿病、慢性淋巴性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、慢性溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬变或多发性脑脊髓硬化症中的任一种或多种的诊断标志物中的应用。

[0027] 本发明的目的之三在于提供一种检测循环免疫复合物含量的试剂盒或集合试剂，其能准确的检测循环免疫复合物的含量。

[0028] 为实现上述目的，本发明的技术方案为：

[0029] 用于检测所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的诊断试剂盒，所述诊断试剂盒的固相载体上包被有所述循环免疫复合物的捕获剂，所述诊断试剂盒还含有同所述捕获剂结合并可作为定量的检测试剂。

[0030] 进一步，所述捕获剂为补体C1q或补体C1q抗体、抗人IgG抗体、IgM抗体或Fc γ R，所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体。

[0031] 优选的，所述检测试剂为辣根过氧化物酶标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV抗体。

[0032] 进一步，所述捕获剂为抗人过氧化物还原酶IV抗体，所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人IgG抗体、IgM抗体。

[0033] 优选的，所述检测试剂为辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG抗体或IgM抗体。

[0034] 本发明的目的之四在于提供过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的检测方法，该方法是基于上述试剂盒来完成含量检测的，准确度高。

[0035] 为实现上述目的，本发明的技术方案为：

[0036] 运用所述的诊断试剂盒检测过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物绝对含量的方法，具体包括以下步骤：

[0037] 1) 从循环系统取样，作待测样品；以已知含量的过氧化物还原酶IV的抗原-抗体复合物作标准样品；

[0038] 2) 以不小于0.01 μ g/mL的补体C1q蛋白包被于固定载体上，将待测样品和标准样品平行与包被有补体C1q蛋白的固定载体孵育，再加入所述检测试剂孵育，为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体，所述检测试剂的效价大于等于100,000，所述检测试剂的稀释体积比不大于3200倍体积稀释；

[0039] 3) 用仪器分别读取待测样品组和标准样品组的数值，通过与标准样品组的比较，求得待测样品的循环免疫复合物含量。

[0040] 进一步，所述补体C1q蛋白的浓度为 $\geq 25\mu$ g/mL，效价为128000的所述检测试剂作1000倍体积稀释。

[0041] 进一步，所述待测样品为血清或血浆，作不大于1000倍体积稀释。

[0042] 进一步，所述待测样品为血清或血浆，作不大于50倍体积稀释，加入显色剂后，用酶标仪测在OD_{450nm}条件下读取数值。

[0043] 运用所述的诊断试剂盒检测类风湿关节炎患者血清中过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物相对含量的方法：

[0044] 1) 取样类风湿关节炎患者血清和正常人血清或血浆，分别作0-50倍体积稀释，将稀释后的血清或血浆作为样本，分别命名为患者样本和对照样本；

[0045] 2) 以不小于0.01 μ g/mL的补体C1q蛋白包被于固定载体上，将患者样本和对照样本平行与包被有补体C1q蛋白的固定载体孵育，再加入所述检测试剂孵育，为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人过氧化物还原酶IV单抗，所述

检测试剂的效价大于或等于100000;

[0046] 3) 加入显色剂显色后,用仪器分别读取患者样本和对照样本的数值,并对数值进行统计分析,所述患者样本和对照样本的含量比为1-300:1。

[0047] 进一步,效价为128000的所述检测试剂作1000倍体积稀释。

[0048] 运用所述的诊断试剂盒检测类风湿关节炎患者血清中过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物相对含量的方法,具体包括以下步骤:

[0049] 1) 取样类风湿关节炎患者血清和正常人血清,分别作0-50倍体积稀释,将稀释后的血清作为样本,分别命名为患者样本和对照样本;

[0050] 2) 将捕获剂包被于固定载体上,将所述患者样本和对照样本平行与包被有捕获剂的固定载体孵育,再加入所述检测试剂孵育,所述捕获剂为抗人过氧化物还原酶IV抗体,所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人IgG、IgM抗体;或所述捕获剂为抗人IgG、IgM 抗体或Fc γ R,所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人过氧化物还原酶IV单抗;

[0051] 3) 加入显色剂显色后,用仪器分别读取类风湿关节炎患者血清和正常人血清的数值,并对数值进行统计分析,所述患者样本和对照样本的含量比为1-300:1。

[0052] 进一步,所述的循环免疫复合物相对含量的方法:步骤3)中所述患者样本和对照样本的含量比为1-20:1。

[0053] 运用所述的诊断试剂盒检测类风湿关节炎患者血清中过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物相对含量的方法,具体包括以下步骤:

[0054] 1) 取样类风湿关节炎患者血清和正常人血清,分别作0-50倍体积稀释,将稀释后的血清作为样本,分别命名为患者样本和对照样本;

[0055] 2) 将捕获剂包被于固定载体上,将所述患者样本和对照样本平行与包被有捕获剂的固定载体孵育,再加入所述检测试剂孵育,所述捕获剂为抗人过氧化物还原酶IV抗体,所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人IgG、IgM抗体;或所述捕获剂为抗人IgG、IgM 抗体或Fc γ R,所述检测试剂为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化物酶或 β -半乳糖苷酶标记的抗人过氧化物还原酶IV单抗;

[0056] 3) 加入显色剂显色后,用仪器分别读取类风湿关节炎患者血清和正常人血清的数值,并对数值进行统计分析,所述患者样本和对照样本的含量比为 1-300:1。

[0057] 进一步,步骤3)中所述患者样本和对照样本的含量比为1-20:1。

[0058] 本发明的目的之五在于提供过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的捕获剂的应用,该应用为疾病,尤其是类风湿关节炎患者疾病的诊断提供了最佳的方案。

[0059] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0060] 所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的捕获剂在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用。

[0061] 进一步,所述捕获剂包括补体C1q或补体C1q抗体、过氧化物还原酶IV的特异性抗体捕、抗人IgG、IgM抗体或Fc γ R捕获

[0062] 进一步,所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物在制备类风湿关节炎早期诊断试剂中的应用。

[0063] 进一步,在制备类风湿关节炎的预示和/或活动度判断和/或治疗反应性诊断试剂

中的应用。

[0064] 所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的捕获剂在制备骨关节炎、系统性红斑狼疮、皮炎、强直性脊柱炎、硬皮病、结节性多动脉炎、Wegener 肉芽肿病、慢性淋巴细胞甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、慢性溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化或多发性脑脊髓硬化症中的任一种或多种的诊断试剂中的应用。

[0065] 本发明的有益效果在于：1本发明首次证实了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在；2本发明首次证实了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物可以作为类风湿关节炎的标志物，特别在类风湿关节炎早期诊断中；3本发明建立了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的含量检测方法，其可以精准的检测患者血清中的循环免疫复合物含量，重复性好；4过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物其诊断能力高于RF和anti-CCP；5过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物也可以作为其它几种疾病的诊断标志物，且区分度高。

附图说明

[0066] 图1为免疫蛋白组学方法证实类风湿关节炎血清中存在过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的电泳图；A为从类风湿关节炎循环免疫复合物中分离出的抗原蛋白点，箭头所示为过氧化物还原酶IV；B为从正常人循环免疫复合物中分离出的抗原蛋白点；C为溶胀液处理，抗原抗体分离，经离心后和Protein G Sepharose微球上结合的IgG。

[0067] 图2为图1-A图中箭头所示过氧化物还原酶IV MALDI-TOF/TOF质谱测序图谱。

[0068] 图3高效液相色谱法分离出的类风湿关节炎患者血清组分中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物检测结果分析。

[0069] 图4羊抗人IgG抗体作为捕获剂与人补体C1q作为捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物结果分析。

[0070] 图5抗人过氧化物还原酶IV抗体作为捕获剂与人补体C1q作为捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物结果分析。

[0071] 图6为过氧化物还原酶IV免疫复合物ELISA标准曲线，横坐标为过氧化物酶IV免疫复合物标准品的稀释浓度，纵坐标为各稀释浓度标准品对应的OD₄₅₀值。

[0072] 图7为ELISA试剂盒在检测类风湿关节炎中的受试者工作曲线分析图，其中横坐标为敏感性，纵坐标为(100-特异性)。

[0073] 图8为类风湿关节炎患者过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度与DAS28 评分相关性分析。

具体实施方式

[0074] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0075] 以下将参照附图，对本发明的优选实施例进行详细描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如分子克隆实验指南(第三版，J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译，科学出版社，2002年)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件进行。

[0076] 氨基酸的缩写如下：

[0077] 甘氨酸gly G;丝氨酸Ser S;丙氨酸ala A;苏氨酸thr T;缬氨酸val V;异亮氨酸ile I;亮氨酸leu L;酪氨酸tyr Y;苯丙氨酸phe F;组氨酸his H;脯氨酸pro P;天冬氨酸asp D;甲硫氨酸met M;谷氨酸glu E;色氨酸trp W;赖氨酸lys K;半胱氨酸cys C;精氨酸arg R

[0078] 本具体实施方式共分为四个部分,第一部分证实过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在,其中通过方法1)免疫共沉淀结合二维凝胶电泳;2)ELISA 定性检测;3)分子筛结合高效液相色谱。第二部分筛选和验证了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物能被不同类型的捕获剂捕获。第三部分建立了基于C1q 作为捕获剂的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的定量检测。第四部分将建立的定量检测方法用于临床,得到不同的实验数据。

[0079] 第一部分过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在

[0080] 实施例1应用免疫共沉淀结合二维凝胶电泳方法证实血清中过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在

[0081] 本发明通过免疫蛋白组学方法验证是否存在过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物,尤其过氧化物还原酶IV的免疫复合物是否存在于类风湿关节炎患者循环系统中。

[0082] 一试验原理

[0083] 免疫复合物是以抗原和抗体的复合物形式存在,Protein G Sepharose4B 具有和抗体IgG结合的特性。因而,首先应用Protein G Sepharose4B吸附血清中抗体,这样免疫复合物也随同抗体一起被Protein G Sepharose4B捕获;然后用DMP(庚二亚氨酸二甲酯二盐酸盐)使抗体与Protein G发生共价交联,使血清中的抗体稳定地固定在Protein G Sepharose微球上,而不能被溶胀液分离,但抗原抗体之间的结合可以被溶胀液分离,用溶胀液分离出抗体结合的抗原成分,通过离心方法收集上清,获取抗原,这样得到的抗原就是在血清中以循环免疫复合物形式存在的抗原。将抗原通过二维凝胶电泳的方法分离,取点进行质谱测序,分析抗原种类。

[0084] 二试验步骤

[0085] 1.将血清中循环免疫复合物定向固定:将100 μ I血清和1.5mI Protein G Sepharose4B(质量百分比为50%的微粒)在4 $^{\circ}$ C反应1小时,通过离心的方法去除未结合的循环免疫复合物。加入0.1moI/L PBS1mI,清洗3次。

[0086] 2.将循环免疫复合物中IgG交联到Protein G微粒上:加入偶联缓冲液(30mmoI/L DMP和100mmoI/L三乙醇胺的混合液),室温混合反应30分钟,离心去除未反应的DMP,加入终止液(100mmoI/L三乙醇胺)反应30分钟,再用0.1moI/L PBS1mI,清洗3次。

[0087] 3.分离循环免疫复合物中的抗原:加入100 μ I溶胀液(7M Urea,2moI/L thiourea,质量百分浓度为2%的两性离子去污剂(CHAPS)),使循环免疫复合物中的抗原解离,通过离心,抗体由于交联牢固固定在Protein G微粒上,收集到的上清视为循环免疫复合物中的抗原。

[0088] 4.等点聚焦:在抗原溶液中按照如下比例加入IPG和DTT(250uI溶胀贮液+1.25uI IPG buffer+15uI1M DTT),4摄氏度下,12000转/分1小时,取蛋白上清,测定蛋白浓度后行等电聚焦。

[0089] 等电聚焦条件:胶条:3-11NL;上样量:600-700 μ g;电压时间:38000-40000vhr;步骤:20摄氏度4小时、50v8小时、500v1小时、1000v 1小时、8000v2小时(线性)、8000v5小时

(快捷)

[0090] 5.电泳:将胶条在如下比例的二巯基苏糖醇(DTT)和碘乙酰胺(IAA)平衡溶液中室温平衡各15分钟(5mI平衡液:DTT0.05g,IAA0.2g);电泳:将5×SDS电泳缓冲液稀释为1X后电泳。

[0091] 6.取点质谱测序:将经考马斯染色后出现的蛋白点取出,纯水洗涤3次,送中国科学院上海生命科学研究院进行MALDI-TOF/MALDI-TOF/TOF质谱测序,所述蛋白点为存在过氧化物还原酶IV,或如图2所示。

[0092] 三结果

[0093] 从类风湿关节炎血清循环免疫复合物中分离出的抗原成分当中,通过 MALDI-TOF/TOF质谱测序证实存在过氧化物还原酶IV,而在正常人循环免疫复合物中不存在过氧化物还原酶IV,该结果说明在类风湿关节炎当中过氧化物还原酶IV确实有循环免疫复合物形式存在。图1为免疫蛋白组学方法证实类风湿关节炎血清中存在过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的电泳图;分别将5例类风湿关节炎患者混合血清及5例正常人混合血清通过Protein G Sepharose4B 将循环免疫复合物固定在微球上,加入交联剂,防止IgG被溶胀液洗脱;加入溶胀液,分离循环免疫复合物中的抗原成分;收集到的抗原,通过二维凝胶电泳的方法分离,1-A为从类风湿关节炎循环免疫复合物中分离出的抗原蛋白点,箭头所示为过氧化物还原酶IV。1-B所示为从正常人循环免疫复合物中分离出的抗原蛋白点;二者比较,正常人循环免疫复合物中无过氧化物还原酶IV所在蛋白点。图1-C为溶胀液处理,抗原抗体分离,经离心后和Protein G Sepharose 微球上结合的IgG。经二维凝胶电泳分离后,分离成重链和轻链。该结果结合图1-A说明,我们建立的免疫共沉淀分离免疫复合物的方法是可靠的,即Protein G Sepharose微球在加入偶联剂后,即便在溶胀液存在情况下也能稳定结合抗体 IgG。通过离心方法,上清中能有与IgG结合的抗原成分存在。该结果说明在类风湿关节炎当中过氧化物还原酶IV确实有循环免疫复合物形式存在。

[0094] 实施例2应用过氧化物还原酶IV循环免疫复合物阳性对照证实血清中该循环免疫复合物的存在

[0095] 一、体外生成过氧化物还原酶IV免疫复合物

[0096] 1、获得重组表达的过氧化物还原酶IV及小鼠抗人过氧化物还原酶IV 单克隆抗体;

[0097] 2、按照3:1摩尔比,混合过氧化物还原酶IV及小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体,4℃过夜,使二者形成免疫复合物;

[0098] 3、将过夜后的反应液14000rpm,4℃,离心15分钟,由于免疫复合物分子量大,去掉上清,剩余沉淀为免疫复合物;

[0099] 二、用C1q包被酶标板后,分别孵育类风湿关节炎患者血清、正常人血清及体外制备的过氧化物还原酶IV免疫复合物、重组表达的过氧化物还原酶 IV及小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体;应用HRP标记的抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体检测,通过TMB显色后,2M硫酸终止反应,OD_{450nm}读值;结果如下表所示:

[0100]

孵育物质	OD _{450nm}
类风湿关节炎患者血清	1.4823

正常人血清	0.2488
体外生成的过氧化物还原酶IV免疫复合物	1.533
重组表达的过氧化物还原酶IV	0.2562
小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体	0.3201

[0101] 三、结果分析：

[0102] 由于类风湿关节炎患者血清OD_{450nm}值与体外生成的过氧化物还原酶IV免疫复合物OD_{450nm}值接近，而重组表达的过氧化物还原酶IV或小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体OD_{450nm}值都接近于正常人，结果说明类风湿关节炎患者血清中确实存在过氧化物还原酶IV免疫复合物。

[0103] 实施例3应用高效液相色谱证实过氧化物还原酶IV循环免疫复合物的存在

[0104] 一、基本原理

[0105] 循环免疫复合物是抗原与抗体的结合物，其分子量及体积都比游离的抗原及抗体大，所以能通过高效液相色谱仪将循环免疫复合物从血清中分离出来。进而对血清中分离出的大分子量组分证实其中以免疫复合物形式存在的具体物质。

[0106] 二、试验步骤

[0107] 血清组分分离参见文献方法“Xiaoyan Zhao, Nwora Lance Okeke, Orr Sharpe, Franak M Batliwalla, Annette T Lee, Peggy P Ho, Beren H Tomooka, Peter K Gregersen and William H Robinson. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy 2008, 10:R94”，所得到的各个分子量大小不同的组分，再通过实施例2所述方法检测各组分当中过氧化物还原酶IV免疫复合物含量。

[0108] 三、结果

[0109] 图3为高效液相色谱仪分离的各组分中过氧化物还原酶IV免疫复合物含量分析图。由于血清中免疫复合物等大分子物质体积大，经过分子筛速度快，所以在第一个峰中出现，即图3-A的a峰。分析各峰中过氧化物还原酶IV免疫复合物含量，即图3-B，结果显示过氧化物还原酶IV免疫复合物在a峰中的含量明显高于b和c峰，进一步证实类风湿关节炎患者血清中确实存在过氧化物还原酶IV免疫复合物。

[0110] 第二部分过氧化物还原酶IV循环免疫复合物的捕获剂的筛选

[0111] 过氧化物还原酶IV循环免疫复合物为过氧化物还原酶IV作为抗原，与循环系统中的抗体形成的抗原-抗体复合物。所以，过氧化物还原酶IV的特异性抗体可作为备选捕获剂；能捕获抗体(IgG)的物质，也可以作为备选捕获剂。通过将备选捕获剂包被于酶标板上，并捕获血清中的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物，进一步验证了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在，同时，筛选出几种特异性高的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的捕获剂，用于后期过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的测定。

[0112] 实施例4捕获剂补体C1q和补体C1q的抗体

[0113] 一捕获剂人补体C1q

[0114] 人补体C1q可以购买商标化的产品，如Sigma-Aldrich C1740，也可以通过如下方式制备。

[0115] 取正常人血清低温离心脱脂，加PEG-6000至终浓度为5%沉淀出优球蛋白；4℃

12000rpm离心沉淀,在Ph9.0浓度为0.005mol/L丙二胺-EDTA溶液中4℃下透析;4℃12000rpm离心收集沉淀,将其溶解于Ph8.0的0.02mol/L Tris-HCL 溶液;、通过IgG-Sepharose4B亲和层析柱,亲和峰液体用Ph2.8的0.1mol/L Gly-HCL缓冲液洗脱,洗脱后用0.5mol/L NaHCO₃溶液中和,滴加(NH₄)₂SO₄饱和溶液至50%饱和度;4℃12000rpm离心收集沉淀,溶解沉淀后通过Sephadex G-200凝胶色谱柱,用Ph5.2的0.2mol/L NaAc-HAc缓冲液洗脱;通过绵羊红细胞凝集试验检测出补体C1q峰,收集此峰液体,透析,冻干,低温保存;

[0116] 采用浓度为25μg/ml人补体C1q包被酶标板,待测血清用1:50稀释,1:1000 稀释的HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗(效价为128000)作为检测抗体检测20份类风湿关节炎、20份正常人血清中人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物水平,分析结果差异,结果详见表1。

[0117] 二其它物种补体C1q捕获循环免疫复合物或抗原-抗体复合物

[0118] 人类的补体C1q与其他哺乳类动物补体C1q与在氨基酸序列、及蛋白结构和功能上很接近,与免疫球蛋白的Fc段补体受体及与C1r、C1s的结合无种属特异性,(滕庆、何晓珑、倪庆东.猪血补体成分在人循环免疫复合物测定中的应用.中华医学检验杂志1995年9月第18卷第5期286-288),为进一步验证,我们从兔和猪的血清中提取补体C1q,作为捕获剂包板,检测人血清中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物。

[0119] 采用人补体C1q制备方法,分别从兔、猪、马、牛中提取补体C1q;采用浓度为25μg/ml兔、猪、马、牛补体C1q包被酶标板,待测血清用1:50稀释,1:1000 稀释的HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗作为检测抗体检测20份类风湿关节炎、20份正常人血清中人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物水平;将5种不同捕获剂所测得的人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物进行卡方检验,分析结果差异,结果详见表1。

[0120] 表1不同种属补体C1q作为捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物结果分析

[0121]

	类风湿关节炎OD _{450nm} (N=20)	正常人OD _{450nm} (N=20)
人补体C1q	1.378	0.895
兔补体C1q	1.401*	0.893**
猪补体C1q	1.355*	0.867**
马补体C1q	1.358*	0.878**
牛补体C1q	1.379*	0.889**

[0122] *:P>0.05vs类风湿关节血清中以人补体C1q为捕获剂;** :P>0.05vs正常人血清中以人补体C1q 为捕获剂;

[0123] 上述结果提示,以兔、猪、马、牛补体C1q为捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物能得到与人补体C1q为捕获剂相似的效果。该结果可推导到与人补体C1q氨基酸序列相似的其他哺乳动物或物种中补体C1q或其功能性片段用做捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物。其中,人补体C1q A 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0124] 三补体C1q抗体捕获

[0125] 由于天然存在的免疫复合物中的IgG能与C1q结合,在循环系统中存在的免疫复合物本身有部分即以抗原+抗体+C1q三者结合形成的复合物形式存在。所以,以特异性的人补

体C1q抗体作为捕获剂,可以捕获该复合物。采用浓度为5 μ g/ml的抗人补体C1q抗体包被酶标板,待测血清用1:50体积稀释,1:1000 体积稀释的HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗作为检测抗体检测20 份类风湿关节炎,结果和表1中所测结果相符。

[0126] 实施例5抗人IgG抗体捕获剂

[0127] 一以羊抗人IgG抗体为捕获剂捕获人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物检测方法

[0128] 以羊抗人IgG抗体3 μ g/ml包被酶标板,待测血清用1:50稀释,1:1000稀释的HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗作为检测抗体检测20份类风湿关节炎、20份正常人血清中人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物水平;将上述方法测得的人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物与用补体C1q为捕获剂的方法进行相关性,比较结果差异;

[0129] 从图4结果提示,两种方法检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物结果基本一致, $R^2=0.8469$, $P<0.0001$ 。说明用抗人IgG抗体为捕获剂、HRP标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体为检测抗体检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物可得到以人补体C1q为捕获剂,以HRP标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体为检测抗体相似的结果。

[0130] 二以抗人过氧化物还原酶IV抗体为捕获剂捕获人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物

[0131] 以小鼠抗人过氧化物还原酶IV抗体3 μ g/ml包被酶标板,待测血清用1:50 体积比稀释,1:1000体积比稀释的HRP标记的羊抗人IgG抗体作为检测抗体检测20份类风湿关节炎、20份正常人血清中人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物水平;将上述方法测得的人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物与用补体C1q 为捕获剂、HRP标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体为检测抗体的方法进行相关性,比较结果差异;

[0132] 由图5可见,用抗人过氧化物还原酶IV抗体为捕获剂,HRP标记的抗人IgG 抗体为检测抗体可得到以人补体C1q为捕获剂,以HRP标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体为检测抗体相似的结果。

[0133] 实施例6以Fc γ R(包括CD16、CD32、CD64)为捕获剂

[0134] 以Fc γ R(包括CD16、CD32、CD64)为捕获剂,以HRP标记的抗人过氧化物还原酶IV抗体为检测抗体的过氧化物还原酶IV循环免疫复合物检测方法:分别采用浓度为3 μ g/ml的人CD16、CD32、CD64包被酶标板,待测血清用1:50 体积稀释,1:1000体积稀释的HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗作为检测抗体检测20份类风湿关节炎、20份正常人血清中人过氧化物还原酶IV 循环免疫复合物水平;

[0135] 将3种不同捕获剂所测得的人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度与以人补体C1q为捕获剂HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗作为检测抗体所得结果进行卡方检验,分析其差异,详见表2;

[0136] 表2不同Fc γ R作为捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物结果分析

[0137]

	类风湿关节炎OD _{450nm} (N=20)	正常人OD _{450nm} (N=20)
人补体C1q	1.378	0.895
CD16	1.391*	0.887**
CD32	1.345*	0.833**
CD64	1.399*	0.842**

[0138] 上述结果提示,以不同Fc γ R为捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物能得到与人补体C1q为捕获剂相似的效果。该结果可推导到与人Fc γ R氨基酸序列相似的其他哺乳动物或物种中Fc γ R(包括CD16、CD32、CD64)或其功能性片段用做捕获剂检测人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物。

[0139] 第三部分过氧化物还原酶IV循环免疫复合物定量检测方法的建立及定量检测试剂盒

[0140] 为了建立精确且稳定的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的测定方法,本发明还进行了抗体配对实验,进一步建立了其含量的测定方法,用于构建优良的类风关检测试剂盒。过氧化物还原酶IV循环免疫复合物试剂盒的组成:固相载体、免疫复合物捕获剂,被可定量的染料标记的过氧化物还原酶IV单抗;还包括其它常规试剂,如稀释剂、洗涤剂、封闭液等。

[0141] 实施例7基于捕获剂为补体C1q的过氧化物还原酶IV循环免疫复合物含量检测方法

[0142] 过氧化物还原酶IV循环免疫复合物试剂盒的组成:酶标板、捕获剂C1q, 戊二醛二步法辣根过氧化物酶(HRP)标记小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗,及其它常规试剂。具体如下:

[0143] 一捕获剂人补体C1q的制备

[0144] 人补体C1q可以购买商标化的产品,如Sigma-Aldrich C1740,也可以通过如下方式制备。

[0145] 取正常人血清低温离心脱脂,加PEG-6000至终浓度为5%沉淀出优球蛋白;4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心沉淀,在Ph9.0浓度为0.005mol/L丙二胺-EDTA溶液中4 $^{\circ}$ C下透析;4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心收集沉淀,将其溶解于Ph8.0的0.02mol/L Tris-HCL 溶液;、通过IgG-Sepharose4B亲和层析柱,亲和峰液体用Ph2.8的0.1mol/L Gly-HCL缓冲液洗脱,洗脱后用0.5mol/L NaHCO₃溶液中和,滴加(NH₄)₂SO₄饱和溶液至50%饱和度;4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心收集沉淀,溶解沉淀后通过Sephadex G-200凝胶色谱柱,用Ph5.2的0.2mol/L NaAc-HAc缓冲液洗脱;通过绵羊红细胞凝集试验检测出补体C1q峰,收集此峰液体,透析,冻干,低温保存;

[0146] 二、戊二醛二步法辣根过氧化物酶(HRP)标记小鼠抗人过氧化物还原酶 IV单抗

[0147] 称取HRP25mg溶于1.25%戊二醛溶液中,于室温静置过夜。反应后的酶溶液经Sephadex G-25层析柱,用生理盐水洗脱。流速控制在1ml/1分钟,收集棕色流出液。如体积大于5ml,则以PEG浓缩至5ml。放置25ml小烧杯中,缓慢搅拌。将待标记的抗体12.5mg用生理盐水稀释至5ml,搅拌下逐滴加入酶溶液中。用1M PH9.5碳酸缓冲液0.25ml,继续搅拌3小时。加0.2M赖氨酸0.25ml,混匀后,置室温2小时。在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4 $^{\circ}$ C 1小时。3000rpm离心半小时,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15M PH7.4的PBS中。将上述溶液装入透析袋中,对0.15M PH7.4的PB 缓冲盐水透析,去除铵离子后(用萘氏试剂检测),10,000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装后,冰冻保存(本发明中所用的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗效价为1:12,8000)

[0148] 三、包被人补体C1q

[0149] 将提取的人补体C1q按照不同浓度在碱性条件下4 $^{\circ}$ C与ELISA板孵育过夜。

[0150] 四、实验方法

[0151] 1、待测血清样品的获得

[0152] 所有待测类风湿关节炎(RA)、骨关节炎(OA)、系统性红斑狼疮(SLE)血清及正常人血清均由中山医科大学第一附属医院提供。

[0153] 2、待测血清样品的处理和保存

[0154] 将收集的促凝血清样品4℃过夜后经3,000rpm离心30分钟,取上清,100μI 分装,-70℃保存。

[0155] 3、最佳人补体C1q包被浓度和HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗最佳浓度的确定

[0156] 采用方阵滴定法,具体步骤如下:(1)将人补体C1q用包被液倍比稀释(100μg/ml、50μg/ml、25μg/ml、12.5μg/ml、6.25μg/ml、3.125μg/ml),包被酶标板,100μI/孔,置4℃湿盒孵育过夜,洗板机洗涤3次,5min/次,拍干;(2)加入100μI/孔封闭液,37℃湿盒封闭1h,洗板机洗涤3次,5min/次,拍干;(3)加入待测血清样品,100μI/孔,37℃湿盒作用1h,洗板机洗涤3次,5min/次,拍干;(4)将HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗倍比稀释(1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000),加入酶标板中,100μI/L,37℃湿盒孵育30分钟,洗板机洗涤3次,5min/次,拍干;(5)加入TMB底物100μI/孔,37℃避光显色15min后,加入100μI/孔2moI/L硫酸终止反应;(6)检测:用酶标仪测OD_{450nm}值。同时以质量百分浓度为1%的BSA的PBS溶液作空白对照,以P/N值最大的人补体C1q和小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗的稀释度为最佳工作浓度。

[0157] 分别将人补体C1q和小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗作系列稀释,进行方阵试验,结果见表3。方阵滴定结果显示,当人补体C1q25μg/ml浓度稀释,小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗以1:1000倍体积稀释时,OD_{450nm}值大于1.0,阴阳性血清OD_{450nm}比值(P/N)最大。因此选择人补体C1q的最佳包被浓度为25μg/ml;小鼠抗人过氧化物还原酶IV单抗的最佳体积稀释倍数为1:1000,上述最佳包被浓度均为阈浓度,在大于阈浓度时,同样可以实现相同的作用,但经济成本增加。

[0158] 表3人补体C1q和小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体最佳工作浓度的确定

[0159]

人补体 C1q 稀释 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	小鼠抗人过氧化物还原酶IV抗体的稀释倍数						
	1000	2000	4000	8000	16000	32000	
类风湿关节炎患者	100	1.851	1.833	1.624	1.546	1.442	1.333
血清 OD _{450nm} 值 (P 值)	50	1.745	1.733	1.637	1.529	1.421	1.316
	25	1.762	1.611	1.545	1.452	1.317	1.283
	12.5	1.621	1.578	1.504	1.453	1.311	1.201
	6.25	1.543	1.432	1.411	1.322	1.295	1.178
	3.125	1.523	1.422	1.409	1.307	1.281	1.133
	正常人血清 OD _{450nm} 值 (N 值)	100	1.251	1.233	1.141	1.132	1.111
50	1.131	1.128	1.117	1.105	1.086	1.079	
25	1.120	1.114	1.101	1.094	1.083	1.072	
12.5	1.109	1.103	1.094	1.077	1.070	1.062	
6.25	1.093	1.088	1.084	1.075	1.062	1.041	
3.125	1.084	1.072	1.069	1.055	1.043	1.035	
P/N 值	100	1.480	1.487	1.423	1.366	1.298	1.227
	50	1.543	1.536	1.466	1.384	1.308	1.220
	25	1.573	1.446	1.403	1.327	1.216	1.197
	12.5	1.462	1.431	1.375	1.349	1.225	1.131
	6.25	1.412	1.316	1.302	1.230	1.219	1.132
3.125	1.405	1.326	1.318	1.239	1.228	1.095	

[0160] 4待测血清最适体积稀释倍数的确定

[0161] 以浓度为25 $\mu\text{g/ml}$ 人补体C1q包被酶标板,加入1:20、1:50、1:100、1:200 体积稀释倍数待测血清,再加入浓度为1:1000(体积计)HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体,选择P/N值最大时的血清稀释浓度作为最佳工作浓度。

[0162] 根据确定的人补体C1q和HRP标记的小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体最佳工作浓度,将待测血清作不同倍数的稀释,进行ELISA检测,每个稀释度重复3次,求出样品的平均P值和N值,确定待测血清的最佳工作浓度。结果见表4,当待测血清作1:50稀释时,P/N值最大为1.438,因此确定最佳血清体积稀释倍数为1:50。其中1:50为稀释倍数阈值,当体积稀释倍数小于1:50时,同样可以实现相同的作用。

[0163] 表4待测血清最佳稀释工作浓度

样品	待测血清稀释倍数			
	1:20	1:50	1:100	1:200
[0164] 类风湿关节炎 OD _{450nm} 值的平均值 (P)	1.743	1.723	1.311	1.152
正常人 OD _{450nm} 值平均值 (N)	1.217	1.198	1.103	1.021
P/N	1.432	1.438	1.189	1.128

[0165] 第四部分过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的临床应用

[0166] 将上述测定方法用于类风湿关节炎及其它疾病的血清循环免疫复合物含量测定,证实了类风湿关节炎患者血清内的循环免疫复合物含量区别度高,其可作为诊断类风关患者的标志诊断物。

[0167] 实施例8基于捕获剂补体C1q的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物(绝对)含量和(相对)含量的检测方法

[0168] 一循环免疫复合物标准品制备

[0169] 1) 用1:2质量比的重组表达的人过氧化物还原酶IV和小鼠抗人过氧化物还原酶IV单克隆抗体混合,所述重组表达的人过氧化物还原酶IV的制备方法参见背景技术中提及的专利文献;

[0170] 2) 5%和2.5%聚乙二醇(PEG)-6000沉淀免疫复合物(以质量百分浓度计);

[0171] 3) 用PBS重悬沉淀,并透析去除PEG-6000;

[0172] 4) 用Sephocrys-400凝胶过滤层析除去无关免疫球蛋白;

[0173] 5) PBS透析,浓度调整到适当浓度;

[0174] 二待测血清样品中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物(绝对)定量方法

[0175] 将含1 μ g/ml人过氧化物还原酶IV循环免疫复合物按照如下浓度梯度倍比稀释(200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml、6.25ng/ml、3.125 ng/ml、1.5625ng/ml、0.7813ng/ml),100 μ l/孔加于酶标板中,每个稀释度重复 3次,按建立的过氧化物还原酶IV循环免疫复合物ELISA方法检测,同时设定空白(PBS)对照,结果见表5和图6。根据循环免疫复合物浓度及其对应的OD_{450nm}值作线性回归分析,得到线性回归公式:Y=0.0037X+1.083 (R²=0.9815) (Y=OD_{450nm}值,X=循环免疫复合物浓度(ng/ml)),将待测血清样品所测得的OD_{450nm}值带入上述公式中计算,得到待测血清样品所含循环免疫复合物浓度。将标准品稀释到1.5625ng/ml时,OD_{450nm}值为1.088,略大于回归公式中1.083值,所以本试剂盒检测范围为待测样品过氧化物还原酶IV 循环免疫复合物浓度大于1.5625ng/ml。

[0176] 表5过氧化物还原酶IV循环免疫复合物ELISA标准曲线建立及检测范围分析

	过氧化物还原酶IV循环免疫复合物倍比稀释浓度 (ng/ml)									
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7813	0
[0177] OD _{450nm} 平均值	1.812	1.419	1.321	1.173	1.165	1.125	1.092	1.088	1.072	1.023

[0178] 三阴阳性临界值的确定及过氧化物还原酶IV循环免疫复合物(表6中简称复合物)敏感性 & 特异性分析,详见表6(正常人血清)和表7(RA患者血清)。

[0179] 表6100份正常人血清过氧化物还原酶IV循环免疫复合物ELISA检测结果

[0180]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
复合物	0.05759	0.04004	0.03700	0.01117	0.04322	0.04423	0.03520	0.02537
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	9	10	11	12	13	14	15	16
复合物	0.03932	0.03465	0.05468	0.02755	0.01357	0.02568	0.03521	0.03753
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	17	18	19	20	21	22	23	24
复合物	0.03783	0.01245	0.01455	0.02605	0.02344	0.00983	0.05633	0.02445
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	25	26	27	28	29	30	31	32
复合物	0.03954	0.04733	0.01414	0.02279	0.02835	0.02901	0.01038	0.02359
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	33	34	35	36	37	38	39	40
复合物	0.01816	0.01241	0.02133	0.01912	0.02367	0.01258	0.02668	0.03244
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	41	42	43	44	45	46	47	48
复合物	0.03788	0.03825	0.04511	0.02177	0.03281	0.02317	0.02021	0.04220
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	49	50	51	52	53	54	55	56
复合物	0.04611	0.03249	0.01375	0.01408	0.03127	0.02590	0.02429	0.03133
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	57	58	59	60	61	62	63	64
复合物	0.03539	0.02592	0.03011	0.03467	0.03365	0.04219	0.01471	0.01037
($\mu\text{g/ml}$)								
编号	65	66	67	68	69	70	71	72
复合物	0.02033	0.02734	0.02244	0.01552	0.03213	0.01523	0.02825	0.01092

(μg/ml)								
编号	73	74	75	76	77	78	79	80
复合物	0.02345	0.02903	0.01437	0.02231	0.03331	0.01700	0.02630	0.02311

(μg/ml)								
编号	81	82	83	84	85	86	87	88
复合物	0.02139	0.02075	0.02057	0.03277	0.02366	0.02496	0.02103	0.02730

(μg/ml)								
编号	89	90	91	92	93	94	95	96
复合物	0.02133	0.01390	0.02577	0.01533	0.02057	0.02433	0.02076	0.02199

(μg/ml)				
编号	97	98	99	100
复合物	0.03429	0.02353	0.02238	0.01799

表 7 100 份 RA 血清过氧化物还原酶IV循环免疫复合物（简称复合物）ELISA 检测结果

[0181]

(μg/ml)								
编号	1	2	3	4	5	6	7	8
复合物	0.11135	0.14140	0.09414	0.16834	0.09919	0.13992	0.11263	0.10322

(μg/ml)								
编号	9	10	11	12	13	14	15	16
复合物	0.22123	0.08935	0.09827	0.04451	0.03501	0.08131	0.10432	0.16021

(μg/ml)								
编号	17	18	19	20	21	22	23	24
复合物	0.16021	0.15254	0.18578	0.17875	0.14524	0.10816	0.11811	0.06725

(μg/ml)								
编号	25	26	27	28	29	30	31	32
复合物	0.14487	0.11903	0.16826	0.15167	0.16877	0.08259	0.09918	0.09825

(μg/ml)								
编号	33	34	35	36	37	38	39	40
复合物	0.10564	0.17344	0.12798	0.07455	0.07811	0.05511	0.05632	0.13446

	编号	41	42	43	44	45	46	47	48
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.18233	0.13341	0.10357	0.13590	0.07366	0.11156	0.12961	0.15238
	编号	49	50	51	52	53	54	55	56
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.11278	0.06978	0.10359	0.07133	0.12412	0.11447	0.13671	0.10459
	编号	57	58	59	60	61	62	63	64
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.07001	0.13088	0.06335	0.12977	0.10622	0.10310	0.12179	0.11913
	编号	65	66	67	68	69	70	71	72
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.14976	0.07399	0.11121	0.07522	0.09819	0.03924	0.11358	0.1222
[0182]	编号	73	74	75	76	77	78	79	80
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.0678	0.13004	0.14433	0.09895	0.10240	0.11790	0.13321	0.12089
	编号	81	82	83	84	85	86	87	88
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.06341	0.11744	0.13011	0.138321	0.12321	0.11721	0.07211	0.06978
	编号	89	90	91	92	93	94	95	96
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.16390	0.17243	0.14815	0.099802	0.08552	0.17367	0.11003	0.18578
	编号	97	98	99	100				
	复合物 ($\mu\text{g/ml}$)	0.17062	0.06761	0.07278	0.13208				

[0183] 所述类风湿关节炎患者血清和正常人血清的含量比为1-300:1,经统计分析,所述类风湿关节炎患者血清和正常人血清的含量比优选为1-20:1。

[0184] 表8受试者工作曲线临界值及特异性、敏感性分析结果

复合物	敏感性%	95%CI	特异性% ($\mu\text{g/ml}$)	95%CI	Likelyhood ratio
> 0.07962	100.0	85.75% to 100.0%	4.348	0.1100% to 21.95%	1.05

	> 0.08206	100.0	85.75% to 100.0%	8.696	1.071% to 28.04%	1.10
	> 0.08362	100.0	85.75% to 100.0%	13.04	2.775% to 33.59%	1.15
	> 0.08416	100.0	85.75% to 100.0%	17.39	4.951% to 38.78%	1.21
	> 0.08498	95.83	78.88% to 99.89%	17.39	4.951% to 38.78%	1.16
	> 0.08561	95.83	78.88% to 99.89%	21.74	7.460% to 43.70%	1.22
	> 0.08571	95.83	78.88% to 99.89%	26.09	10.23% to 48.40%	1.30
	> 0.08576	95.83	78.88% to 99.89%	30.43	13.21% to 52.92%	1.38
	> 0.08624	95.83	78.88% to 99.89%	34.78	16.38% to 57.27%	1.47
	> 0.08688	95.83	78.88% to 99.89%	39.13	19.71% to 61.46%	1.57
	> 0.08727	95.83	78.88% to 99.89%	43.48	23.19% to 65.51%	1.70
	> 0.08757	95.83	78.88% to 99.89%	47.83	26.82% to 69.41%	1.84
	> 0.08838	95.83	78.88% to 99.89%	52.17	30.59% to 73.18%	2.00
	> 0.08916	95.83	78.88% to 99.89%	56.52	34.49% to 76.81%	2.20
	> 0.08951	95.83	78.88% to 99.89%	60.87	38.54% to 80.29%	2.45
	> 0.09009	95.83	78.88% to 99.89%	65.22	42.73% to 83.62%	2.76
	> 0.09061	95.83	78.88% to 99.89%	69.57	47.08% to 86.79%	3.15
	> 0.09131	95.83	78.88% to 99.89%	73.91	51.60% to 89.77%	3.67
	> 0.09208	95.83	78.88% to 99.89%	78.26	56.30% to 92.54%	4.41
	> 0.09266	95.83	78.88% to 99.89%	82.61	61.22% to 95.05%	5.51
	> 0.09308	91.67	73.00% to 98.97%	82.61	61.22% to 95.05%	5.27
	> 0.09381	91.67	73.00% to 98.97%	86.96	66.41% to 97.22%	7.03
[0186]	> 0.09493	91.67	73.00% to 98.97%	91.30	71.96% to 98.93%	10.54
	> 0.09566	87.50	67.64% to 97.34%	91.30	71.96% to 98.93%	10.06
	> 0.09659	87.50	67.64% to 97.34%	95.65	78.05% to 99.89%	20.13
	> 0.09754	87.50	67.64% to 97.34%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.09791	83.33	62.62% to 95.26%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.09855	79.17	57.85% to 92.87%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1002	75.00	53.29% to 90.23%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1015	70.83	48.91% to 87.38%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1017	66.67	44.68% to 84.37%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1019	62.50	40.59% to 81.20%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1026	58.33	36.64% to 77.89%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1035	54.17	32.82% to 74.45%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1038	50.00	29.12% to 70.88%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1040	45.83	25.55% to 67.18%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1057	41.67	22.11% to 63.36%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1079	37.50	18.80% to 59.41%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1089	33.33	15.63% to 55.32%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1101	29.17	12.62% to 51.09%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1111	25.00	9.773% to 46.71%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1116	20.83	7.132% to 42.15%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1124	16.67	4.735% to 37.38%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1132	12.50	2.656% to 32.36%	100.0	85.18% to 100.0%	
	> 0.1144	8.333	1.026% to 27.00%	100.0	85.18% to 100.0%	
[0187]	> 0.1161	4.167	0.1054% to 21.12%	100.0	85.18% to 100.0%	

表 8 中将过氧化物循环免疫复合物简称为复合物

[0188] 取100份正常人血清,100份RA患者血清,用上述建立的过氧化物还原酶IV循环免疫复合物双夹心ELISA的方法检测。将各样品所得过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度值分组带入GraphPad Prism软件进行受试者工作曲线(ROC)分析,选择(特异性%+敏感性%)-1为最大值所对应的过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度值为临界值,如表8所示,0.09754 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 为阴阳性临界值,待测样品的过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度值大于0.09754 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 为过氧化物还原酶IV循环免疫复合物阳性,小于或等于则为阴性。如表8所示,以0.09754 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 为阴阳性临界值,过氧化物还原酶IV敏感性为87.50%,特异性为100%,结果见图7。

[0189] 实施例9过氧化物还原酶IV循环免疫复合物预示类风湿关节炎疾病发生

[0190] 收集20例无关节痛正常人血清,随访半年,其中有1例过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度升高(0.11432 $\mu\text{g}/\text{mI}$),随访4月后,出现关节疼痛,临床诊断为类风湿关节炎。说明在正常人中筛查过氧化物还原酶IV循环免疫复合物预示类风湿关节炎疾病发生。检测方法参照实施例8。

[0191] 实施例10过氧化物还原酶IV循环免疫复合物可作为类风湿关节炎疾病活动度判断指标

[0192] 取15例类风湿关节炎患者血清检测过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度,与疾病活动度评分DAS28评分进行相关性分析,结果提示呈明显正相关, $R^2=0.8961$, $P<0.0001$ 。上述结果说明过氧化物还原酶IV循环免疫复合物可作为类风湿关节炎疾病活动度指标,反应病程变化,详见图8。

[0193] 实施例11过氧化物还原酶IV循环免疫复合物可作为类风湿关节炎治疗反应性评价指标

[0194] 表9类风湿关节炎抗风湿治疗前后过氧化物还原酶IV循环免疫复合物变化

	治疗前	治疗后
[0195] OD _{450nm} 值的平均值	0.10210	0.8766

[0196] 取25例类风湿关节炎患者抗风湿治疗前后血清,分别检测(检测方法参照实施例5)其中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物浓度,结果发现,或如表9所示,治疗后病情好转的类风湿关节炎患者血清中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物较治疗前明显降低,通过t检验验证($P<0.001$)。说明过氧化物还原酶IV循环免疫复合物可作为类风湿关节炎治疗反应性评价指标。

[0197] 实施例12过氧化物还原酶IV循环免疫复合物与RF和anti-CCP区分度分析

[0198] 将正常人和类风湿关节炎血清各50份,分别进行RF和anti-CCP检测(RF用透射比浊法测定,anti-CCP用:欧蒙(德国)医学实验诊断有限公司提供试剂盒检测),将检测结果进行受试者工作曲线(ROC)分析,得到曲线下方面积进行比较:anti-CCP曲线下方面积为0.912、RF曲线下方面积为0.903、过氧化物还原酶IV循环免疫复合物曲线下方面积为0.953。敏感性进行比较:anti-CCP:76.3%、RF:62.4%、过氧化物还原酶IV免疫复合物:87.5%;特异性比较:anti-CCP:94.6%、RF:89.3%、过氧化物还原酶IV免疫复合物:100%;说明过氧化物还原酶IV循环免疫复合物作为类风湿关节炎诊断检测指标,其诊断能力高于RF和anti-CCP。

[0199] 表10过氧化物还原酶IV循环免疫复合物、anti-CCP、RF对类风湿关节炎诊断能力比较

[0200]		敏感性(%)	特异性(%)	曲线下面积
	Anti-CCP	76.3	94.6	0.912
	RF	62.4	89.3	0.903
[0201]	过氧化物还原酶IV循环免疫复合物	87.5	100	0.953

[0202] 实施例13过氧化物还原酶IV循环免疫复合物在RF和anti-CCP双阴性类风湿关节炎患者中阳性率分析

[0203] 将上述的100份类风湿关节炎血清(其中早期患者血清26例(病程短于2个月),晚期患者74例),通过RF和anti-CCP检测(RF用透射比浊法测定, anti-CCP用:欧蒙(德国)医学实验诊断有限公司提供试剂盒检测),在早期患者中, RF阴性9例(34.62%)、anti-CCP阴性7例(26.92%)、过氧化物还原酶IV循环免疫复合物阴性4例(15.38%), RF及CCP双阴性5例(19.23%)、RF、anti-CCP及过氧化物还原酶IV循环免疫复合物均阴性2例(7.69%);在晚期患者当中, RF阴性29例(39.19%)、anti-CCP阴性17例(22.97%)、过氧化物还原酶IV循环免疫复合物阴性8例(10.81%)、RF及anti-CCP双阴性16例(21.62%)、RF、anti-CCP及过氧化物还原酶IV循环免疫复合物均阴性6例(8.11%);在早期RF及anti-CCP双阴性患者当中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物阳性3例(60%);在晚期RF及anti-CCP双阴性患者当中过氧化物还原酶IV循环免疫复合物阳性10例(62.5%);说明过氧化物还原酶IV循环免疫复合物作为类风湿关节炎诊断检测指标,可以弥补RF和anti-CCP在类风湿关节炎诊断中的不足,扩大类风湿关节炎实验室诊断的阳性率。结果详见表11。

[0204] 表11过氧化物还原酶IV循环免疫复合物在anti-CCP、RF阴性患者当中的阳性率

		早期	晚期
[0205]	Anti-CCP (-)	7/26	17/74
	RF (-)	9/26	29/74
	过氧化物还原酶IV循环免疫复合物(-)	4/26	8/74
[0206]	RF、anti-CCP (-)	5/26	16/74
	RF、anti-CCP及过氧化物还原酶IV循环免疫复合物(-)	2/26	6/74

[0207] 实施例14过氧化物还原酶IV循环免疫复合物在制备其它疾病诊断试剂中的应用

[0208] 取骨关节炎、系统性红斑狼疮、皮炎、强直性脊柱炎、硬皮病、结节性多动脉炎、Wegener肉芽肿病、慢性淋巴性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、慢性溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬变、多发性脑脊髓硬化症血清，按照实施例5中的方法进行检测，观察结果，如表12所示。

[0209] 表12过氧化物还原酶IV循环免疫复合物在其他疾病中的分布

疾病 (例数)	骨关节炎 (20)	系统性		强直性	甲状腺
		红斑狼疮 (50)	皮炎 (30)	脊柱炎 (20)	功能亢进 (20)
OD _{450nm} 值的平均值	0.8162	0.7906	0.7878	0.7367	0.6733
[0210] 疾病 (例数)	硬皮病(30)	慢性淋		慢性淋	胰岛素
		结节性多 (20)	Wegener肉 (30)	巴性甲 (20)	依赖型 (20)
OD _{450nm} 值的平均值	0.8033	0.7865	0.7333	0.8722	0.6904
疾病 (例数)	重症肌无力(20)	慢性溃疡		慢性淋	胰岛素
		性结肠炎 (30)	恶性贫血 (20)	肺出血 (20)	寻常天 (20)
OD _{450nm} 值的平均值	0.9210	0.8966	0.6521	0.7801	0.9322
[0211] 疾病 (例数)	类天疱疮(30)	原发性胆		多发性脑	
		汁性肝硬 (20)	变(20)	脊髓硬化 (20)	
OD _{450nm} 值的平均值	0.8977	0.6925	0.8711		

[0212] 上述结果说明，过氧化物还原酶IV循环免疫复合物不仅能区分类风湿关节炎与正常人，而且应用实施例1的方法，可以通过设定cutoff值，区分类风湿关节炎与上述18种疾病，得到不同的敏感性和特异性。

[0213] 实施例15实施例8方法的重复性检测

[0214] 一批内重复性测定试验

[0215] 取3份不同时间收集到的类风湿关节炎血清，按实施例5中最佳稀释度稀释，加到抗原包被孔中，每份样品做3次重复ELISA测定。由每份样品的OD_{450nm}值计算出平均OD_{450nm}值

(X)与标准方差(SD),进而计算出每份样品批内变异系数[$CV=(SD/X) \times 100\%$];

[0216] 二批间重复性测定试验

[0217] 同“批内重复性测定试验”的条件相同,用3份不同批次制备的纯化的小鼠抗人过氧化物还原酶IV免疫复合物抗体包被酶标板,对3份不同时间收集到的类风湿关节炎血清进行检测。由每份样品的OD_{450nm}值计算出平均OD_{450nm}值(X)与SD,进而计算出每份样品的批间变异系数。

[0218] 三结果

[0219] 经统计学分析,3份不同时间收集到的类风湿关节炎血清之间批内重复试验OD_{450nm}值的变异系数(CV)为2.44%~2.96%,小于5%;3份不同时间收集到的类风湿关节炎血清3次批间重复试验OD_{450nm}值的CV为2.34%~3.01%,小于5%(表13)。表明建立的过氧化物还原酶IV免疫复合物ELISA方法具有很好的批内及批间重复性。

[0220] 表13重复性试验结果

项目	血清	测定次数	Times of test			平均值	标准差	变异系数
Item	Sera	1st	2nd	3rd	X	SD	% CV	
板内	1	1.245	1.320	1.278	1.281	0.038	2.96%	
Within	2	1.476	1.520	1.550	1.515	0.037	2.44%	
plate	3	0.943	1.010	0.965	0.973	0.034	3.49%	

[0221]

项目	血清	测定批次	Times of test			平均值	标准差	变异系数
Item	Sera	1st	2nd	3rd	X	SD	% CV	
板间	1	1.832	1.790	1.875	1.832	0.043	2.34%	
Among	2	0.732	0.754	0.710	0.732	0.022	3.01%	
plates	3	1.523	1.558	1.480	1.520	0.039	2.57%	

[0222] 本实施例以血清作为生物标本为例对过氧化物还原酶IV免疫复合物的含量进行检测,也可以采用如血浆、尿液、滑膜组织等其他生物标本对过氧化物还原酶IV免疫复合物的含量进行检测。本实施例所列表中,过氧化物还原酶IV免疫复合物简称为复合物。

说明书氨基酸序列表

<110> 重庆联佰博超医疗器械有限公司

<120> 过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物及其应用

<160> 8

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

<223> PREX-4

[0001] Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp Lys Pro Gly Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Ile Ile Pro Asp Pro Ala Gly Lys Leu Lys Tyr Phe Asp Lys
 20 25 30

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

<223> PREX-4

Val Tyr Leu Glu Asp Ser Gly His Thr
 1 5

<210> 3

<211> 5

说明书氨基酸序列表

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

<223> PREX-4

Asp Leu Pro Val Gly

1 5

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

[0002] <223> PREX-4

Leu Ala Trp Ile Asn Thr Pro Arg Arg Gln Gly Gly Leu Gly Pro

1 5 10 15

Ile Arg Ile

18

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

<223> PREX-4

Ile Asp Gly Glu Phe Lys Glu Leu Lys Leu Thr Asp Tyr Arg Gly

1 5 10 15

Lys

说明书氨基酸序列表

16

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

<223> PREX-4

His	Leu	Ser	Lys	Ala	Lys	Ile	Ser	Lys	Pro	Ala	Pro	Tyr	Trp	Glu
1				5					10					15

<210> 7

[0003] <211> 5

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

<223> PREX-4

Asp	Leu	Thr	His	Gln
1				5

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> 表位抗原

<220>

说明书氨基酸序列表

<223> PREX-4

Asp Phe Thr Phe
1 4

<210> 9

<211> 245

<212> PRT

<213> A链

<220>

<223> 补体 C1q

[0004]

Met	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Trp	Leu	Val	Leu	Cys	Val	Leu	Ala	Ile	1	5	10	15
Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Cys	Arg	Ala	Pro	Asp	20	25	30	
Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Arg	Arg	Gly	Arg	Pro	35	40	45	
Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Qln	Gly	Glu	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ile	Arg	50	55	60	
Thr	Gly	Ile	Qln	Gly	Leu	Lys	Gly	Asp	Qln	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	65	70	75	
Ser	Gly	Asn	Pro	Gly	Lys	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	80	85	90	
Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	Gly	Thr	Lys	Gly	Ser	95	100	105	
Pro	Gly	Asn	Ile	Lys	Asp	Qln	Pro	Arg	Pro	Ala	Phe	Ser	Ala	Ile	110	115	120	
Arg	Arg	Asn	Pro	Pro	Met	Gly	Gly	Asn	Val	Val	Ile	Phe	Asp	Thr	125	130	135	
Val	Ile	Thr	Asn	Qln	Glu	Glu	Pro	Tyr	Qln	Asn	His	Ser	Gly	Arg	140	145	150	
Phe	Val	Cys	Thr	Val	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Phe	Qln	Val	155	160	165	
Lou	Ser	Qln	Trp	Glu	Ile	Cys	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Ser	Arg	170	175	180	
Gly	Qln	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Gly	Phe	Cys	Asp	Thr	Thr	Asn	Lys	185	190	195	
Gly	Leu	Phe	Qln	Val	Val	Ser	Gly	Gly	Met	Val	Leu	Qln	Leu	Qln				

说明书氨基酸序列表

		200		205		210									
	Asp	Qln	Val	Trp	Val	Glu	Lys	Asp	Pro	Lys	Lys	Gly	His	Ile	Tyr
[0005]		215		220		225									
	Qln	Gly	Qln	Gly	Ser	Glu	Ala	Asp	Ser	Val	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu
		230		235		240									
	Ile	Phe	Pro	Ser	Ala										
		245													

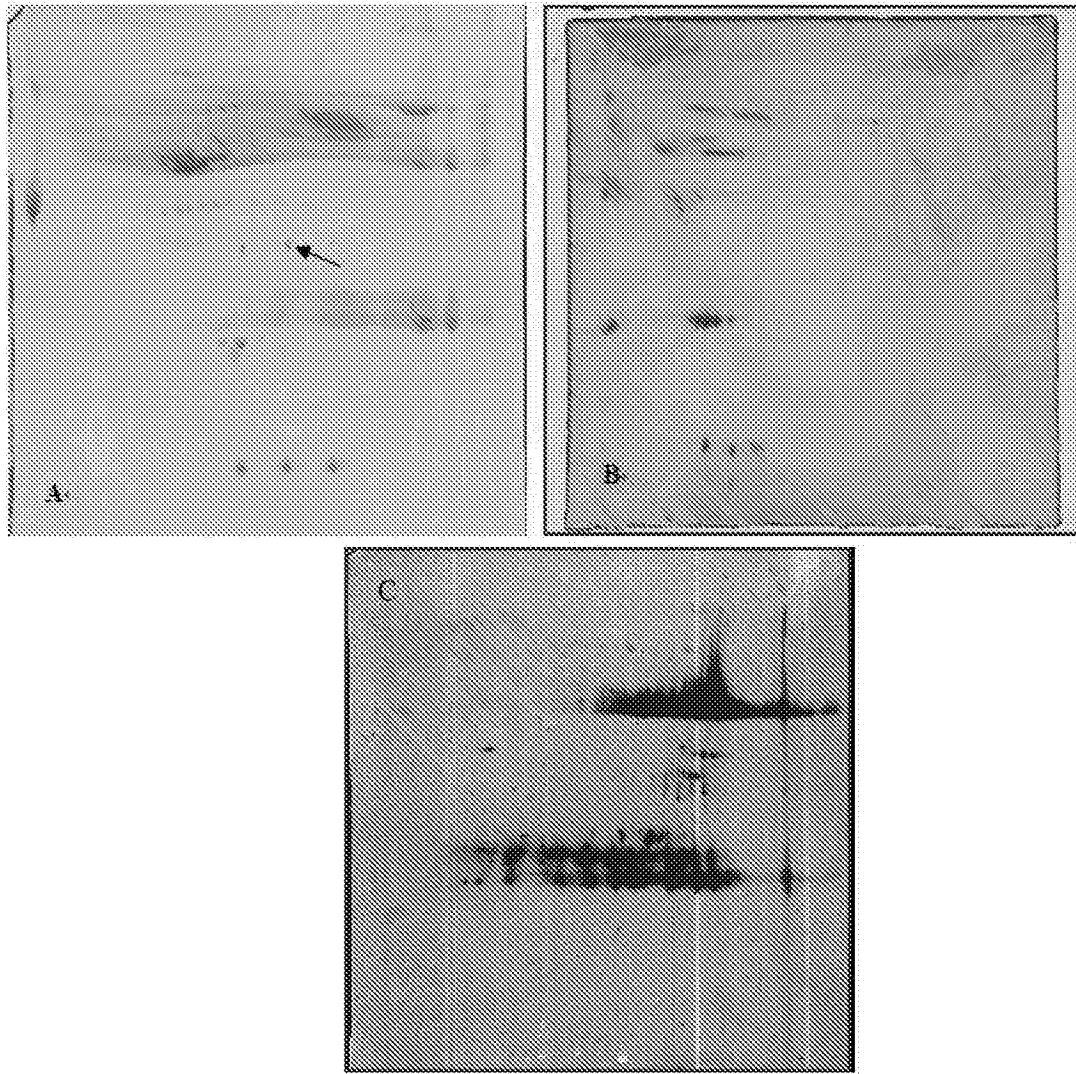


图1

B

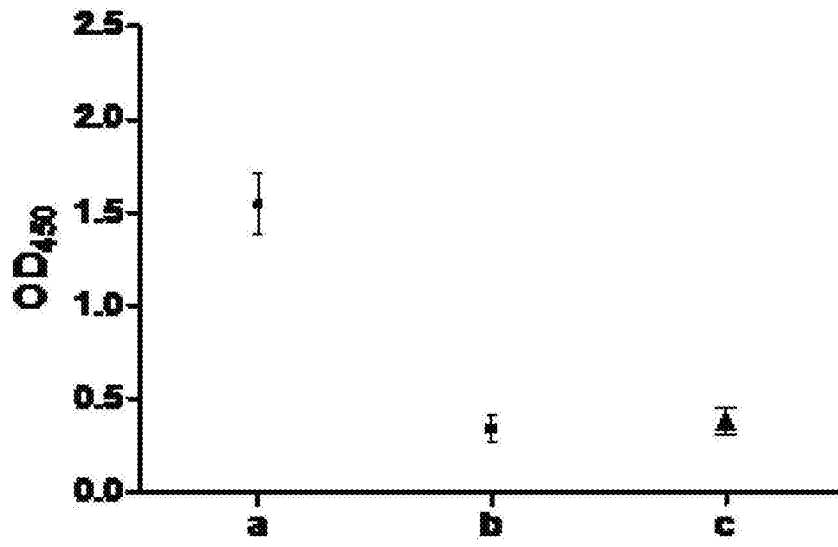


图3

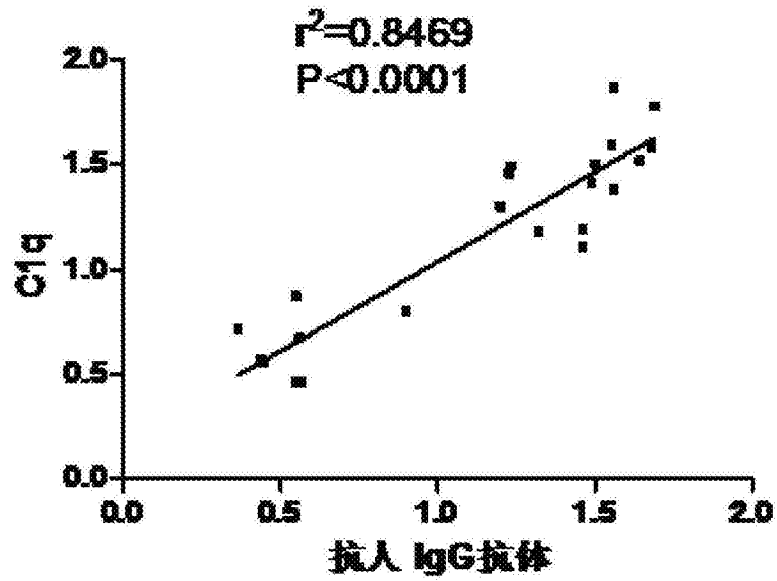


图4

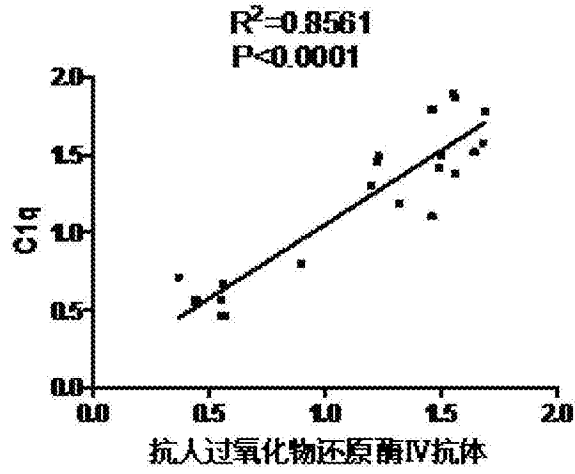


图5

抗人过氧化物还原酶IV抗体

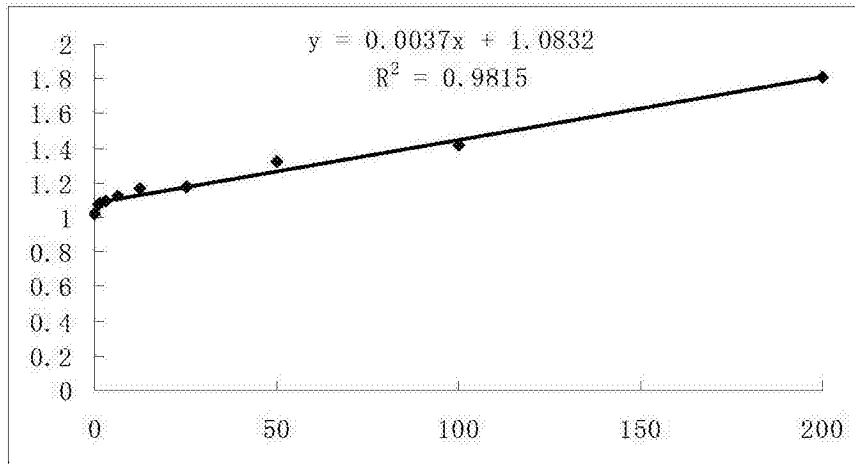


图6

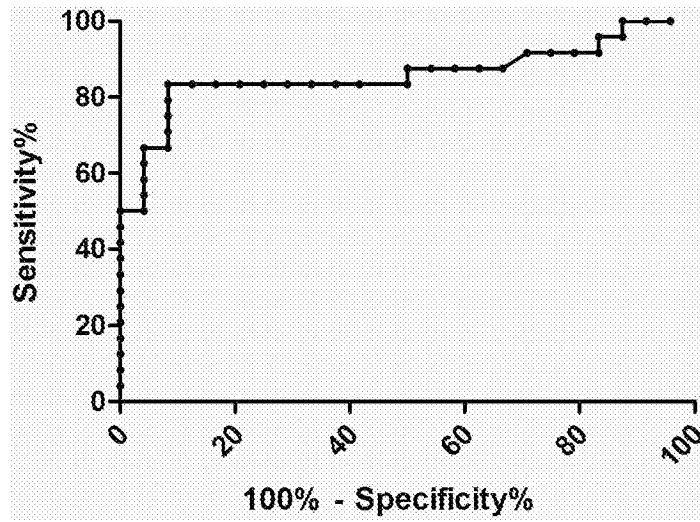


图7

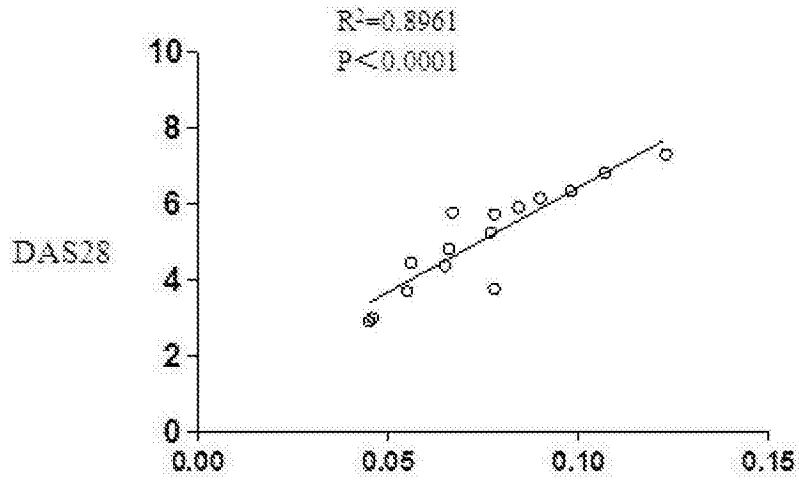


图8

专利名称(译)	过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物及其应用		
公开(公告)号	CN103308674B	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN201310179764.7	申请日	2013-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	重庆联佰博超医疗器械有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆联佰博超医疗器械有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	周继蓉 重庆联佰博超医疗器械有限公司		
[标]发明人	张大 文李玲		
发明人	张大 文李玲		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/577		
优先权	201210560448.X 2012-12-20 CN		
其他公开文献	CN103308674A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学领域，具体证实了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在及可作为类风湿关节炎的诊断标志物，其捕获剂可以作为类风湿关节炎的诊断试剂；本发明还介绍了用于检测权利要求所述的过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物含量的诊断试剂盒，所述诊断试剂盒的固相载体上包被有所述循环免疫复合物的捕获剂，所述诊断试剂盒还含有同所述捕获剂结合并可作为定量的检测试剂；本发明首次证实了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的存在；本发明建立了过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物的含量检测方法，其可以精准的检测患者血清中的循环免疫复合物含量，重复性好；过氧化物还原酶IV的循环免疫复合物其在类风湿关节炎中的诊断能力高于RF和anti-CCP；也可以作为其它几种疾病的诊断标志物，且区分度高。

