



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108398551 B

(45)授权公告日 2020.04.21

(21)申请号 201810186422.0

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.03.07

审查员 李洋

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108398551 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(73)专利权人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾  
大道2076号中国高科大厦六楼A2

(72)发明人 张大准 张永顶 马伟民 王洪涛  
马新民

(74)专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事  
务所(普通合伙) 44285

代理人 王仲凯

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

(54)发明名称

一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗  
核抗体谱检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及酶联免疫技术领域,公开了一种  
用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱  
检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包  
括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有酪蛋  
白、蔗糖、PBS、甘露醇、Tween20、甜菜碱和叠氮  
钠,所述酶标稀释液含有PBS、酪蛋白、对羟基苯  
甲酸钠、PEG、甜菜碱和Proclin300。本发明从酶  
联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通过  
选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长时  
间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制备  
的抗核抗体检测试剂盒具有较佳稳定性,保质期  
在2年以上。

1. 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,其特征在于,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有2%酪蛋白、2%蔗糖、1%甘露醇、0.5%甜菜碱、0.05%Tween20、0.01M PBS、0.05%叠氮钠,pH值为7.4-7.6,余量为水;所述酶标稀释液含有0.01M PBS、2%酪蛋白、0.5%甜菜碱、0.5%对羟基苯甲酸钠、1.5%PEG、0.05% Proclin300,pH值为7.4-7.6,余量为水。

2. 权利要求1所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用。

3. 根据权利要求2所述应用,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒为抗核抗体酶联免疫检测试剂盒。

4. 一种抗核抗体谱检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:

包被有细胞核成分抗原的蛋白芯片、用酶标稀释液稀释的酶标抗体、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被细胞核成分抗原后采用封闭液封闭,所述封闭液含有2%酪蛋白、2%蔗糖、1%甘露醇、0.5%甜菜碱、0.05%Tween20、0.01M PBS、0.05%叠氮钠,pH值为7.4-7.6,余量为水;所述酶标稀释液含有0.01M PBS、2%酪蛋白、0.5%甜菜碱、0.5%对羟基苯甲酸钠、1.5%PEG、0.05% Proclin300,pH值为7.4-7.6,余量为水。

5. 根据权利要求4所述试剂盒,其特征在于,所述细胞核成分抗原选自dsDNA、组蛋白、Sm、U1RNP、SSA-60、SSA-52、SSB、Sc1-70、Jo-1、核糖体P蛋白、PCNA、CENP-B、PM-Sc1、AMA-M2、Mi-2、Ku、核小体、LAMP-2、AGA95中的一种或两种以上。

6. 根据权利要求4或5所述试剂盒,其特征在于,所述细胞核成分抗原采用CB缓冲液、PBS缓冲液或Tris缓冲液为细胞核成分抗原稀释缓冲液进行包被。

7. 根据权利要求4或5所述试剂盒,其特征在于,所述蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上。

8. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上。

9. 权利要求4所述试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

将细胞核成分抗原在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有细胞核成分抗原的蛋白芯片,所述封闭液含有酪蛋白、蔗糖、PBS、甘露醇、Tween20、甜菜碱和叠氮钠;

配制含有PBS、酪蛋白、对羟基苯甲酸钠、PEG、甜菜碱和Proclin300的酶标稀释液并稀释酶标抗体,获得用酶标稀释液稀释的酶标抗体,然后配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得抗核抗体谱检测试剂盒;

其中,所述封闭液含有2%酪蛋白、2%蔗糖、1%甘露醇、0.5%甜菜碱、0.05%Tween20、0.01M PBS、0.05%叠氮钠,pH值为7.4-7.6,余量为水;所述酶标稀释液含有0.01M PBS、2%酪蛋白、0.5%甜菜碱、0.5%对羟基苯甲酸钠、1.5%PEG、0.05% Proclin300,pH值为7.4-7.6,余量为水。

## 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫技术领域,具体涉及一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 抗核抗体(ANA)是具有多种细胞核成分的自身抗体,是以真核细胞的核成分为靶抗原的自身抗体的总称,可用于多种自身免疫性疾病的筛查。自身免疫性疾病(AID)是指机体的免疫效应或免疫效应分子,针对自身组织或细胞产生的一系列病理性免疫应答反应,导致自身组织器官损伤的一大类疾病,其发病机理十分复杂多变,往往累及皮肤、浆膜、关节、肾及中枢神经系统等。一般常见的疾病有系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、干燥综合征(SS)、混合性结缔组织病(MCTD)、弥漫性结缔组织病(CTD)、自身免疫性肝炎(AIH)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、系统性硬皮病(PSS)、多肌炎/皮肌炎(PM/DM)等。很多AID是以临床症状出现之前数月甚至数年即呈现自身抗体为特征的慢性疾病,同时自身抗体也可以预示疾病特异性、严重程度和进展。因此对这些自身抗体的筛查和鉴别就有着重要的意义。同时,由于AID的病程一般较长,发作和缓解经常交替出现,因此及时准确检测这些自身抗体也可对AID的早期正确诊断和疗效评价等方面起到很好的辅助作用。

[0003] 目前有很多检测抗核抗体的方法,包括间接免疫荧光分析法或免疫印迹法,但还是存在各自的缺点。间接免疫荧光分析法是通过形成的荧光结合物来推断自身抗体的类别,缺乏一个具体客观的诊断,需要利用其他技术进行二次证实,如免疫印迹法、酶联免疫法等。免疫印记法所需标本量大、操作繁琐、检测时间过长、成本较高等问题。金标渗滤法不能准确地得出具体的项目结果,检测结果的准确性相对较低、灵敏度也较低。传统的琼脂双向扩散法、对流免疫电泳法、间接血凝法和补体结合试验等都具有所需标本量大、操作麻烦、检测时间过长、价格昂贵、检测结果准确性较低等缺点。

[0004] 近年出现了可以检测16种抗核抗体的蛋白芯片,例如CN105021811A。然而,传统的蛋白芯片操作复杂、成本高,且试剂盒的稳定期一般都是2-8℃稳定期1年,稳定性不高。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,使得所述组合物用于制备酶联免疫试剂盒时能够显著提高试剂盒在低温和室温下的稳定性,保存时间延长;

[0006] 本发明的另外一个目的在于提供上述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是用于检测抗核抗体的相关试剂盒;

[0007] 本发明的另外一个目的在于提供一种包含上述组合物的抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法,使得所述试剂盒在低温和室温下具有较长时间的稳定性。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有酪蛋白、蔗糖、PBS、甘露醇、Tween20、甜菜碱和叠氮钠,所述酶标稀释液含有PBS、酪蛋白、对羟基苯甲酸钠、PEG、甜菜碱和Proclin300。

[0010] 针对现有酶联免疫试剂盒稳定较差、保存时间较短的缺陷,本发明意外发现了从制备试剂盒的封闭液和酶标稀释液(用于稀释酶标抗原或抗体用)入手,通过选择合适的组分完善两者的组成,能够显著提高酶联免疫试剂盒的稳定性和保存时间。

[0011] 作为优选,所述封闭液含有2%-4%酪蛋白,2%-5%蔗糖,1%-3%甘露醇,0.5%-1%甜菜碱,0.02%-0.05%Tween20,0.01M PBS,0.05%叠氮钠,pH值为7.4-7.6,余量为水,所述百分比为质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述封闭液所述封闭液含有2%的酪蛋白、2%的蔗糖、0.01M PBS、1%甘露醇、0.05%Tween20、0.5%甜菜碱和0.05%叠氮钠,pH值为7.4-7.6,余量为超纯水。

[0012] 作为优选,所述酶标稀释液含有0.01M PBS,2%-4%酪蛋白,0.5%-1%甜菜碱,0.2%-1%对羟基苯甲酸钠、1.5%-5%PEG、0.05%Proclin300,pH值为7.4-7.6,余量为水,所述百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述酶标稀释液含有0.01M PBS、2%的酪蛋白、0.5%对羟基苯甲酸钠、1.5%PEG、0.5%甜菜碱和0.05%Proclin300,pH值为7.4-7.6,余量为水。其中PEG优选为PEG10000。

[0013] 本发明利用上述组合物进行抗核抗体酶联免疫试剂盒的制备,与采用常规的封闭液和酶标稀释液的抗核抗体酶联免疫试剂盒相比,在低温(2-8℃)下,本发明试剂盒在放置24个月后仍然能够保持较高的稳定性,而对照的试剂盒在放置18个月后就出现很大程度的不稳定性;在室温(18-28℃)下,本发明试剂盒在放置9个月后仍然能够保持较高的稳定性,而对照的试剂盒在放置6个月后就出现很大程度的不稳定性,放置9个月后就无法保证检测的准确性。

[0014] 基于上述优异的技术效果,本发明提出了所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是在制备抗核抗体酶联免疫检测试剂盒中的应用。

[0015] 同时,本发明还提供一种抗核抗体谱检测试剂盒,包括以下组分:

[0016] 包被有细胞核成分抗原的蛋白芯片、用酶标稀释液稀释的酶标抗体、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被细胞核成分抗原后采用封闭液封闭,所述封闭液含有酪蛋白、蔗糖、PBS、甘露醇、Tween20、甜菜碱和叠氮钠,所述酶标稀释液含有PBS、酪蛋白、对羟基苯甲酸钠、PEG、甜菜碱和Proclin300,所述封闭液和酶标稀释液与前述组合物方案相同。

[0017] 作为优选,所述细胞核成分抗原选自dsDNA、组蛋白、Sm、U1RNP、SSA-60、SSA-52、SSB、Sc1-70、Jo-1、核糖体P蛋白、PCNA、CENP-B、PM-Sc1、AMA-M2、Mi-2、Ku、核小体、LAMP-2、AGA95中的一种或两种以上;在本发明具体实施方式中,所述细胞核成分抗原为dsDNA、组蛋白、Sm、U1RNP、SSA-60、SSA-52、SSB、Sc1-70、Jo-1、核糖体P蛋白、PCNA、CENP-B、PM-Sc1、AMA-M2、Mi-2、Ku、核小体、LAMP-2和AGA95。

[0018] 在包被中,细胞核成分抗原采用CB缓冲液、PBS缓冲液或Tris缓冲液为细胞核成分抗原稀释缓冲液进行包被;作为优选,所述缓冲液选自pH9.6的CB缓冲液、pH7.4的PBS缓冲液(优选0.01M)或pH8.5的Tris缓冲液(优选20mM),更优选地,在缓冲液中添加PEG或PVP、海

藻糖、甘油以及Proclin300,同时添加了水溶性的环糊精,可使包被更稳定、细胞核成分抗原包被点更规则、更圆,CV更小。

[0019] 其中,水溶性环糊精可以是Captisol、2-羟基- $\beta$ -环糊精或羧甲基- $\beta$ -环糊精等,浓度为0.02%;PEG的浓度为2.5%,PVP的浓度为0.5-0.6%,海藻糖的浓度为5-10%,甘油的浓度为15%,Proclin300浓度为0.05%,所述百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v)。

[0020] 更为具体地,在包被过程中:

[0021] dsDNA、Sm、U1RNP、Sc1-70、Jo-1、组蛋白、核小体7种抗原分别用PH7.4-PH7.6的0.01M的PBS缓冲液(其中含0.5%的PVP、5%的海藻糖、0.05%的Proclin300、0.02%的2-羟基- $\beta$ -环糊精)进行稀释包被,终浓度分别为40ug/ml、10ug/ml、10ug/ml、15ug/ml、20ug/ml、18ug/ml、12ug/ml;

[0022] SSA60、SSA52、SSB、PCNA、CENP-B、PM-Sc1、核糖体P蛋白7种抗原分别用PH7.4-PH7.6的0.01M的PBS缓冲液(其中含5%的PEG4000、10%的海藻糖、0.05%的Proclin300、0.02%的2-羟基- $\beta$ -环糊精)进行稀释包被,终浓度分别为10ug/ml、8ug/ml、8ug/ml、20ug/ml、25ug/ml、15ug/ml、15ug/ml。

[0023] Mi-2和Ku分别用PH9.6的CB缓冲液稀释至浓度30ug/ml和60ug/ml。

[0024] AMA-M2、LAMP-2和AGA95分别用PH8.5的0.02M的Tris缓冲液(其中含5%的PEG4000、0.05%的Proclin300、2.5%的海藻糖,以及0.02%的Captisol和15%的甘油)进行稀释包被,终浓度分别为:25ug/ml、20ug/ml和40ug/ml。

[0025] 此外,本发明试剂盒中的蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上;更为具体地,至少一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC);至少一个样品质控点(SC)和一个酶标质控点(EC);至少5个标准曲线点(S1-S5)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0026] 在具体实施方式中,本发明蛋白芯片上还包含一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC);一个样品质控点(SC)和一个酶标质控点(EC);5个参考曲线点(S1-S5)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0027] 其中,阳性质控点可以是人IgG,则对应使用的酶标抗体就是抗人IgG的酶标。阳性质控点也可以是包被BSA偶联的DNP,则对应使用的酶标抗体就是抗人IgG的酶标以及抗DNP的酶标的混合液。

[0028] 而阴性质控点可以是低于反应信号值的微量浓度的人IgG,或采用其他的无关蛋白来替代;样品质控点可以是兔抗人的IgG或其他的抗人IgG(如羊抗人IgG);酶标质控点可以是人IgG(酶标是抗人IgG的酶标),或其他的抗兔的抗体(酶标用的是兔抗人IgG),或者抗羊的抗体(酶标就用羊抗人的IgG)。所述参考曲线点在具体实施过程中是5个由低到高浓度的人IgG,用于内部定标,结果的判读。

[0029] 芯片本身的位置参考点包被的是2ug/ml的人IgG溶液,主要是对阵列取值时的定位作用。

[0030] 本发明所述酶标抗体中酶标记物为酶标抗人IgG,如羊抗人或兔抗人IgG;所述酶可选择常规的酶,如辣根过氧化物酶、AP,亲和素,吡啶酯等。

[0031] 本发明使用的显色液是增强型化学发光底物(ECL),通过荧光检测装置或仪器进

行反应结果的读取。在其他实施例中也可以使用其他的显色底物,如p-NPP,TMB等。

[0032] 本发明还对应提供了所述试剂盒的制备方法,包括:

[0033] 将细胞核成分抗原在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有细胞核成分抗原的蛋白芯片,所述封闭液含有酪蛋白、蔗糖、PBS、甘露醇、Tween20、甜菜碱和叠氮钠;

[0034] 配制含有PBS、酪蛋白、对羟基苯甲酸钠、PEG、甜菜碱和Proclin300的酶标稀释液并稀释酶标抗体,获得用酶标稀释液稀释的酶标抗体,然后配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得抗核抗体谱检测试剂盒。

[0035] 由以上技术方案可知,本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制备的抗核抗体检测试剂盒具有较佳稳定性,保质期在2年以上。

### 具体实施方式

[0036] 本发明公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述组合物、试剂盒和应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的组合物、试剂盒和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0037] 以下就本发明所提供的一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法做进一步说明。

[0038] 实施例1:本发明所述抗核抗体谱检测试剂盒的制备

[0039] 1、细胞核成分抗原和相关蛋白的包被

[0040] 蛋白芯片阵列中的PC、NC、S1、S2、S3、S4、S5、EC点分别包被的是2ug/ml、0.01ug/ml、0.1ug/ml、0.5ug/ml、2ug/ml、4ug/ml、8ug/ml、2ug/ml的人IgG,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液(其中含2.5%的PEG4000、5%的海藻糖,0.05%的Proclin300,以及15%的甘油)。

[0041] SC点包被的是2ug/ml的羊抗人IgG抗体,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液。

[0042] Loc点包被的是2ug/ml的人IgG,稀释缓冲液是PH9.6的CB缓冲液。

[0043] dsDNA、Sm、U1RNP、Sc1-70、Jo-1、组蛋白、核小体7种抗原分别用PH7.4-PH7.6的0.01M的PBS缓冲液(其中含0.5%的PVP、5%的海藻糖、0.05%的Proclin300、0.02%的2-羟基-β-环糊精)进行稀释,终浓度分别为40ug/ml、10ug/ml、10ug/ml、15ug/ml、20ug/ml、18ug/ml、12ug/ml。

[0044] SSA60、SSA52、SSB、PCNA、CENP-B、PM-Sc1、核糖体P蛋白7种抗原分别用PH7.4-PH7.6的0.01M的PBS缓冲液(其中含5%的PEG4000、10%的海藻糖,0.05%的Proclin300、0.02%的2-羟基-β-环糊精)进行稀释,终浓度分别为10ug/ml、8ug/ml、8ug/ml、20ug/ml、25ug/ml、15ug/ml、15ug/ml。

[0045] Mi-2和Ku分别用PH9.6的CB缓冲液稀释至浓度30ug/ml和60ug/ml。

[0046] AMA-M2、LAMP-2和AGA95分别用PH8.5的0.02M的Tris缓冲液(其中含5%的PEG4000、0.05%的Proclin300,2.5%的海藻糖,以及0.02%的Captisol和15%的甘油)进

行稀释,终浓度分别为:25ug/ml、20ug/ml和40ug/ml。

[0047] 所有按照上述稀释好的抗体或抗原分别用0.22um的滤膜过滤,然后通过BioDot精密点样仪按照要求进行阵列的包被。全部蛋白包被完成之后,将芯片用膜盖住,置于2-8℃,过夜包被24-30h。蛋白芯片阵列可参照如下表呈现的阵列,也可根据实际需要调整,不做限制:

[0048] 表1蛋白芯片阵列

[0049]	PC	S1	dsDNA	SSA60	PCNA	Loc
	NC	S2	组蛋白	SSA52	CENP-B	核小体
	SC	S3	Sm	Sc1-70	PM-Sc1	LAMP-2
	EC	S4	U1RNP	Jo-1	AMA-M2	AGA95
	Loc	S5	SSB	核糖体P蛋白	Mi-2	Ku

[0050] 2、封闭

[0051] 取出包被的芯片,用PH7.4的PBST洗涤液清洗3次,然后每孔加入150u1的封闭液(含有2%的酪蛋白、2%的蔗糖、0.01M PBS、1%甘露醇、0.05%Tween20、0.5%甜菜碱和0.05%叠氮钠,pH值为7.4-7.6,余量为超纯水),室温封闭1h,然后拍干,于湿度15%以下,室温放置,干燥4h,后密封、2-8℃保存,获得包被有细胞核成分抗原的蛋白芯片。

[0052] 3、配制酶标稀释液、酶标抗体、显色液、样品稀释液和浓缩洗涤液

[0053] 酶标稀释液:含有0.01M PBS、2%的酪蛋白、0.5%对羟基苯甲酸钠、1.5%PEG、0.5%甜菜碱和0.05%Proclin300,pH值为7.4-7.6,余量为水;

[0054] 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体;

[0055] 使用时,用酶标稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体稀释至6K倍(酶标抗体浓度)。

[0056] 显色液:ECL显色剂。

[0057] 样品稀释液:0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05%Tween20,0.01%酪蛋白,pH7.4。

[0058] 洗涤液:0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05%Tween20,pH7.4。

[0059] 上述包被有细胞核成分抗原的蛋白芯片、酶标稀释液稀释的酶标抗体和显色液、以及样品稀释液和洗涤液组成本发明抗核抗体谱检测试剂盒。

[0060] 4、检测方法

[0061] (1)取出蛋白芯片,平衡至室温;

[0062] (2)加样:将阴性和阳性对照血清、以及用样品稀释液稀释了101倍的待测样品,每孔100uL加入待测芯片孔中反应。

[0063] (3)温育:室温静置反应30min。加300uL洗涤液,洗涤3次,每次静置1min。

[0064] (4)加酶标抗体:每孔加入100uL酶标抗体。

[0065] (5)温育:室温静置反应30min。加300uL洗涤液,洗涤3次,每次静置1min。

[0066] (6)显色:每孔加入ECL显色剂50uL,室温静置,避光反应30min。

[0067] (7)测定:30min内,用化学发光芯片分析仪读取并计算每个反应孔对应抗体的信号值;,通过S1-S5五点校准的标准曲线,来计算并判断结果的阴阳性及强度。

[0068] 实施例2:本发明所述试剂盒稳定性检测

[0069] 对照试剂盒:按照实施例1的方法进行制备,区别在于封闭液为常规的含3%的

BSA、0.05%Proclin300的PBS缓冲液,PH7.4;酶标稀释液采用现有技术CN105021811A中的酶标稀释液:0.46%三羟甲基氨基甲烷、5%的山羊血清、0.8%的NaCl、0.1%的吐温20、0.04%的乙二胺四乙酸、0.5%对羟基苯甲酸钠、0.1%的Proclin300,余量为去离子水。

[0070] 试验试剂盒:实施例1试剂盒;

[0071] 检测方法:将两种试剂盒分别置于室温(18-28℃)和低温(2-8℃)下放置一段时间,然后采用相同血清按照实施例1检测方法检测,统计仪器信号值,结果见表2-5。

[0072] 1、实施例1试剂盒低温下的稳定性数据

[0073] 表2

[0074]

对应抗原	0个月	6个月	6个月/0个月	12个月	12个月/0个月
dsDNA	31055	30625	98.62%	29744	95.78%
组蛋白	26642	26063	97.83%	25152	94.41%
Sm	26212	25298	96.51%	25064	95.62%
UIRNP	8376	8301	99.10%	8193	97.82%
SSA-60	12261	12688	103.48%	11862	96.75%
SSA-52	9887	9682	97.93%	9505	96.14%
SSB	6633	6583	99.25%	6416	96.73%
Scl-70	7125	7069	99.21%	6848	96.11%
Jo-1	14117	14061	99.60%	13462	95.36%
核糖体P蛋白	12867	13096	101.78%	12287	95.49%
PCNA	9621	10024	104.19%	9452	98.24%
CENP-B	5658	5705	100.83%	5396	95.37%
PM-Scl	7026	7131	101.49%	6873	97.82%
AMA-M2	8815	8825	100.11%	8611	97.69%

[0075]

Mi-2	12611	11972	94.93%	11964	94.87%
Ku	14056	14110	100.38%	13696	97.44%
核小体	8391	8236	98.15%	8018	95.55%
LAMP-2	11021	10898	98.88%	10362	94.02%
AGA95	8626	8706	100.93%	8572	99.37%
对应抗原	12个月/6个月	18个月	18个月/0个月	18个月/6个月	18个月/12个月
dsDNA	97.12%	28901	93.06%	94.37%	97.17%
组蛋白	96.50%	25017	93.90%	95.99%	99.46%
Sm	99.08%	24988	95.33%	98.77%	99.70%
UIRNP	98.70%	8065	96.29%	97.16%	98.44%
SSA-60	93.49%	11653	95.04%	91.84%	98.24%
SSA-52	98.17%	9521	96.30%	98.34%	100.17%
SSB	97.46%	6411	96.65%	97.39%	99.92%
Scl-70	96.87%	6793	95.34%	96.10%	99.20%
Jo-1	95.74%	13258	93.92%	94.29%	98.48%
核糖体 P 蛋白	93.82%	12064	93.76%	92.12%	98.19%
PCNA	94.29%	9189	95.51%	91.67%	97.22%
CENP-B	94.58%	5363	94.79%	94.01%	99.39%
PM-Scl	96.38%	6742	95.96%	94.54%	98.09%
AMA-M2	97.58%	8515	96.60%	96.49%	98.89%
Mi-2	99.93%	11886	94.25%	99.28%	99.35%
Ku	97.07%	13281	94.49%	94.12%	96.97%
核小体	97.35%	7982	95.13%	96.92%	99.55%
LAMP-2	95.08%	10215	92.69%	93.73%	98.58%
AGA95	98.46%	8288	96.08%	95.20%	96.69%
对应抗原	24个月	24个月/0个月	24个月/6个月	24个月/12个月	24个月/18个月
dsDNA	28455	91.63%	92.91%	95.67%	98.46%
组蛋白	24688	92.67%	94.72%	98.16%	98.68%
Sm	24051	91.76%	95.07%	95.96%	96.25%
UIRNP	7728	92.26%	93.10%	94.32%	95.82%
SSA-60	11186	91.23%	88.16%	94.30%	95.99%
SSA-52	9095	91.99%	93.94%	95.69%	95.53%
SSB	6114	92.18%	92.88%	95.29%	95.37%
Scl-70	6535	91.72%	92.45%	95.43%	96.20%
Jo-1	12853	91.05%	91.41%	95.48%	96.95%
核糖体 P 蛋白	11868	92.24%	90.62%	96.59%	98.38%
PCNA	9021	93.76%	89.99%	95.44%	98.17%
CENP-B	5112	90.35%	89.61%	94.74%	95.32%

[0076]	PM-Scl	6296	89.61%	88.29%	91.60%	93.38%
	AMA-M2	8193	92.94%	92.84%	95.15%	96.22%
	Mi-2	11424	90.59%	95.42%	95.49%	96.11%
	Ku	12847	91.40%	91.05%	93.80%	96.73%
	核小体	7665	91.35%	93.07%	95.60%	96.03%
	LAMP-2	9968	90.45%	91.47%	96.20%	97.58%
	AGA95	7972	92.42%	91.57%	93.00%	96.19%

[0077] 由表2可以看出,本发明试剂盒分别检测了在低温下放置0、6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了24个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、6、12、18个月的检测信号值相比,几乎均处于90%以上,证明本发明所述试剂盒在低温条件下放置24个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0078] 2、实施例1试剂盒室温下的稳定性数据

[0079] 表3

对应抗原	0个月	3个月	3个月/0个月	6个月	6个月/0个月
dsDNA	30758	30269	98%	29585	96%
组蛋白	25316	25263	100%	24168	95%
Sm	26431	25761	97%	25011	95%
UIRNP	8198	8147	99%	7942	97%
SSA-60	12084	12065	100%	11668	97%
SSA-52	9863	9826	100%	9626	98%
SSB	6592	6580	100%	6401	97%
Scl-70	7257	7052	97%	6869	95%
Jo-1	14024	14018	100%	13577	97%
核糖体 P 蛋白	12154	12163	100%	11861	98%
PCNA	9788	9558	98%	9016	92%
CENP-B	5546	5531	100%	5105	92%
PM-Scl	7035	7005	100%	6611	94%
AMA-M2	8831	8628	98%	8165	92%
Mi-2	12250	12235	100%	11813	96%
Ku	13719	13696	100%	12948	94%
核小体	8427	8266	98%	8035	95%
LAMP-2	10905	10886	100%	10311	95%
AGA95	8657	8611	99%	8221	95%
对应抗原	6个月/3个月	9个月	9个月/0个月	9个月/3个月	9个月/6个月
dsDNA	97.74%	28015	91%	92.55%	94.69%
组蛋白	95.67%	23008	91%	91.07%	95.20%

Sm	97.09%	23677	90%	91.91%	94.67%
UIRNP	97.48%	7298	89%	89.58%	91.89%
SSA-60	96.71%	10956	91%	90.81%	93.90%
SSA-52	97.96%	8825	89%	89.81%	91.68%
SSB	97.28%	5968	91%	90.70%	93.24%
Scl-70	97.40%	6586	91%	93.39%	95.88%
Jo-1	96.85%	13026	93%	92.92%	95.94%
核糖体 P 蛋白	97.52%	11045	91%	90.81%	93.12%
PCNA	94.33%	8824	90%	92.32%	97.87%
CENP-B	92.30%	5068	91%	91.63%	99.28%
PM-Scl	94.38%	6262	89%	89.39%	94.72%
AMA-M2	94.63%	7996	91%	92.68%	97.93%
Mi-2	96.55%	11052	90%	90.33%	93.56%
Ku	94.54%	12347	90%	90.15%	95.36%
核小体	97.21%	7703	91%	93.19%	95.87%
LAMP-2	94.72%	10054	92%	92.36%	97.51%
AGA95	95.47%	7921	91%	91.99%	96.35%
对应抗原	12 个月	12 个月/0 个月	12 个月/3 个月	12 个月/6 个月	12 个月/9 个月
dsDNA	24511	80%	80.98%	82.85%	87.49%
组蛋白	22036	87%	87.23%	91.18%	95.78%
Sm	20182	76%	78.34%	80.69%	85.24%
UIRNP	5968	73%	73.25%	75.14%	81.78%
SSA-60	9725	80%	80.61%	83.35%	88.76%
SSA-52	6821	69%	69.42%	70.86%	77.29%
SSB	5112	78%	77.69%	79.86%	85.66%
Scl-70	5266	73%	74.67%	76.66%	79.96%
Jo-1	12147	87%	86.65%	89.47%	93.25%
核糖体 P 蛋白	9928	82%	81.62%	83.70%	89.89%
PCNA	6233	64%	65.21%	69.13%	70.64%
CENP-B	4152	75%	75.07%	81.33%	81.93%
PM-Scl	5037	72%	71.91%	76.19%	80.44%
AMA-M2	6117	69%	70.90%	74.92%	76.50%
Mi-2	9288	76%	75.91%	78.63%	84.04%
Ku	10436	76%	76.20%	80.60%	84.52%
核小体	6012	71%	72.73%	74.82%	78.05%
LAMP-2	8821	81%	81.03%	85.55%	87.74%
AGA95	6136	71%	71.26%	74.64%	77.46%

[0082] 由表3可以看出,本发明试剂盒分别检测了在常温下放置0、3、6、9、12个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了9个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、3、6个月的检测信号值相比,几乎均处于90%以上,证明本发明所述试剂盒在常温条件下放置9个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0083] 3、实施例1试剂盒和对照试剂盒低温下的稳定性数据对比

[0084] 表4

[0085]

	抗原	实施 例 1	对照	对照/实 施例 1		抗原	实施 例 1	对照	对照/实 施例 1
6 个月	dsDNA	30625	30241	98.75%	12 个 月	dsDNA	29744	26885	90.39%
	组蛋白	26063	26126	100.24%		组蛋白	25152	23133	91.97%
	Sm	25298	25164	99.47%		Sm	25064	23521	93.84%
	U1RNP	8301	8219	99.01%		U1RNP	8193	7862	95.96%
	SSA-60	12688	12462	98.22%		SSA-60	11862	11031	92.99%
	SSA-52	9682	9515	98.28%		SSA-52	9505	8928	93.93%
	SSB	6583	6464	98.19%		SSB	6416	6015	93.75%
	Scl-70	7069	7012	99.19%		Scl-70	6848	6336	92.52%
	Jo-1	14061	13886	98.76%		Jo-1	13462	13021	96.72%
	核糖体 P 蛋白	13096	13012	99.36%		核糖体 P 蛋白	12287	11245	91.52%
	PCNA	10024	9976	99.52%		PCNA	9452	9051	95.76%
	CENP- B	5705	5642	98.90%		CENP- B	5396	5115	94.79%
	PM-Scl	7131	7068	99.12%		PM-Scl	6873	6614	96.23%
	AMA- M2	8825	8781	99.50%		AMA- M2	8611	8205	95.29%
	Mi-2	11972	11628	97.13%		Mi-2	11964	11363	94.98%
	Ku	14110	14006	99.26%		Ku	13696	12899	94.18%
核小体	8236	8165	99.14%	核小体	8018	7561	94.30%		
LAMP- 2	10898	10688	98.07%	LAMP- 2	10362	9856	95.12%		
AGA95	8706	8626	99.08%	AGA95	8572	8011	93.46%		
18 个 月	dsDNA	28901	12165	42.09%	24 个 月	dsDNA	28455	686	2.41%
	组蛋白	25017	15024	60.06%		组蛋白	24688	1042	4.22%
	Sm	24988	18644	74.61%		Sm	24051	968	4.02%
	U1RNP	8065	4525	56.11%		U1RNP	7728	465	6.02%
	SSA-60	11653	6636	56.95%		SSA-60	11186	625	5.59%
	SSA-52	9521	5782	60.73%		SSA-52	9095	363	3.99%
	SSB	6411	4461	69.58%		SSB	6114	325	5.32%
	Scl-70	6793	4515	66.47%		Scl-70	6535	299	4.58%
	Jo-1	13258	6182	46.63%		Jo-1	12853	686	5.34%

[0086]

核糖体 P 蛋白	12064	8823	73.13%	核糖体 P 蛋白	11868	752	6.34%
PCNA	9189	6136	66.78%	PCNA	9021	488	5.41%
CENP- B	5363	3363	62.71%	CENP- B	5112	365	7.14%
PM-Scl	6742	4152	61.58%	PM-Scl	6296	248	3.94%
AMA- M2	8515	5254	61.70%	AMA- M2	8193	535	6.53%
Mi-2	11886	6687	56.26%	Mi-2	11424	206	1.80%
Ku	13281	7682	57.84%	Ku	12847	611	4.76%
核小体	7982	5157	64.61%	核小体	7665	245	3.20%
LAMP- 2	10215	5688	55.68%	LAMP- 2	9968	433	4.34%
AGA95	8288	4476	54.01%	AGA95	7972	421	5.28%

[0087] 由表4可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在低温下放置6、12、18、

24个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了18个月的对照试剂盒,其检测信号值开始出现显著下降,结合表2数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0088] 4、实施例1试剂盒和对照试剂盒常温下的稳定性数据对比

[0089] 表5

[0090]

	抗原	实施例 1	对照	对照/实施例 1
3 个月	dsDNA	30269	29011	95.84%
	组蛋白	25263	24598	97.37%
	Sm	25761	25042	97.21%
	U1RNP	8147	8085	99.24%
	SSA-60	12065	11363	94.18%
	SSA-52	9826	9559	97.28%
	SSB	6580	6391	97.13%
	Scl-70	7052	6872	97.45%
	Jo-1	14018	13394	95.55%
	核糖体 P 蛋白	12163	11828	97.25%
	PCNA	9558	9124	95.46%
	CENP-B	5531	5350	96.73%
	PM-Scl	7005	6885	98.29%
	AMA-M2	8628	8402	97.38%
	Mi-2	12235	12021	98.25%
	Ku	13696	13184	96.26%
核小体	8266	8069	97.62%	
LAMP-2	10886	10187	93.58%	

	AGA95	8611	8502	98.73%
6 个月	dsDNA	29585	25633	86.64%
	组蛋白	24168	21019	86.97%
	Sm	25011	22647	90.55%
	UIRNP	7942	5998	75.52%
	SSA-60	11668	9454	81.03%
	SSA-52	9626	8828	91.71%
	SSB	6401	5131	80.16%
	Scl-70	6869	5546	80.74%
	Jo-1	13577	11264	82.96%
	核糖体 P 蛋白	11861	9926	83.69%
	PCNA	9016	7582	84.09%
	CENP-B	5105	4438	86.93%
	PM-Scl	6611	4762	72.03%
	AMA-M2	8165	6889	84.37%
	Mi-2	11813	9961	84.32%
	Ku	12948	10236	79.05%
	核小体	8035	6878	85.60%
	LAMP-2	10311	8664	84.03%
	9 个月	AGA95	8221	6412
dsDNA		28015	1186	4.23%
组蛋白		23008	2626	11.41%
Sm		23677	3187	13.46%
UIRNP		7298	611	8.37%
SSA-60		10956	843	7.69%
SSA-52		8825	528	5.98%
SSB		5968	395	6.62%
Scl-70		6586	320	4.86%
Jo-1		13026	464	3.56%
核糖体 P 蛋白		11045	411	3.72%
PCNA		8824	386	4.37%
CENP-B		5068	209	4.12%
PM-Scl		6262	277	4.42%
AMA-M2		7996	308	3.85%
Mi-2		11052	466	4.22%
Ku		12347	515	4.17%
核小体		7703	338	4.39%
LAMP-2		10054	396	3.94%
AGA95	7921	203	2.56%	

[0092] 由表5可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在常温下放置3、6、9个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了6个月的对照试剂盒,其检测信号值开始出现显著的下降,放置了9个月的对照试剂盒,已经无法准确检测,结合表3数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0093] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应

视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108398551B</a>	公开(公告)日	2020-04-21
申请号	CN201810186422.0	申请日	2018-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
[标]发明人	张大准 张永顶 马伟民 王洪涛 马新民		
发明人	张大准 张永顶 马伟民 王洪涛 马新民		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/5011 G01N33/57484 G01N2550/00 G01N2800/52		
代理人(译)	王仲凯		
审查员(译)	李洋		
其他公开文献	CN108398551A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及酶联免疫技术领域，公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及抗核抗体谱检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包括封闭液和酶标稀释液；所述封闭液含有酪蛋白、蔗糖、PBS、甘露醇、Tween20、甜菜碱和叠氮钠，所述酶标稀释液含有PBS、酪蛋白、对羟基苯甲酸钠、PEG、甜菜碱和Proclin300。本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手，通过选择适宜成分，使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时，以所述组合物制备的抗核抗体检测试剂盒具有较佳稳定性，保质期在2年以上。

对应抗原	0个月	6个月	6个月/0个月	12个月	12个月/0个月
dsDNA	31055	30625	98.62%	29744	95.78%
组蛋白	26642	26063	97.83%	25152	94.41%
Sm	26212	25298	96.51%	25064	95.62%
UIRNP	8376	8301	99.10%	8193	97.82%
SSA-60	12261	12688	103.48%	11862	96.75%
SSA-52	9887	9682	97.93%	9505	96.14%
SSB	6633	6583	99.25%	6416	96.73%
Scl-70	7125	7069	99.21%	6848	96.11%
Jo-1	14117	14061	99.60%	13462	95.36%
核糖体P蛋白	12867	13096	101.78%	12287	95.49%
PCNA	9621	10024	104.19%	9452	98.24%
CENP-B	5658	5705	100.83%	5396	95.37%
PM-Scl	7026	7131	101.49%	6873	97.82%
AMA-M2	8815	8825	100.11%	8611	97.69%