

[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 200710011899.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2007年11月21日

[11] 公开号 CN 101074951A

[22] 申请日 2007.6.26

[21] 申请号 200710011899.7

[71] 申请人 大连医科大学

地址 116027 辽宁省大连市沙河口区中山路
465号

[72] 发明人 燕秋 富力 朱正美 张文利
马悦 王晓琦

[74] 专利代理机构 大连万友专利事务所

代理人 王发

权利要求书2页 说明书10页 附图1页

[54] 发明名称

一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白G糖基化检测试剂及制备方法

[57] 摘要

一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白G糖基化检测试剂及检测方法，其主要是：用与糖链特异结合的凝集素及标记的IgG抗体，对IgG的糖基化进行凝集素一亲和免疫检测，其包括测定含半乳糖末端糖链的IgG糖基化的降低，测定去半乳糖后所暴露的N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的IgG增加，双重测定IgG糖基化的变化即同时测定含半乳糖末端糖链的IgG糖基化的降低和N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的IgG糖基化的增加，并计算两者测定的比值。本发明灵敏特异、客观可靠、简单快速；与确诊的RA病例符合率高，在80-90%，优于现有的一些临床检查指标，可提高IgG早期确诊率。

1. 一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白 G 糖基化检测试剂及检测方法，其特征在于：用与糖链特异结合的凝集素及标记的 IgG 抗体，对 IgG 的糖基化进行凝集素-亲和免疫检测，其包括（1）测定含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化的降低，（2）测定去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的 IgG 增加，（3）双重测定 IgG 糖基化的变化即同时测定含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化的降低，和 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的 IgG 糖基化的增加，并计算两者测定的比值。
2. 根据权利要求 1 所述的早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白 G 糖基化检测试剂及检测方法，其特征在于：（1）所述酶标板（条）的每孔用溶于碳酸盐缓冲液（pH9.6）中的一种特异结合半乳糖末端糖链的花生凝集素包被，浓度为 0.05-20 μ g/ml，体积为 150-400 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜，（2）用 0.01-0.1%吐温（Tween）20-PBS（TPBS）洗涤酶标板 2-5 次，每次 5-30 分钟，（3）加入 200-500 μ l 1-3%牛血清白蛋白（BSA）-TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜，（4）用 TPBS 洗酶标板（条）2-4 次，每次 3-10 分钟，（5）加入待测体液 50-300 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟—1 小时，（6）TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-20 分钟，（7）加 100-300 μ l 辣根过氧化物酶（HRP）标记的 IgG 抗体（1:400-3000），温育 10-30 分钟，（8）TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-20 分钟，（9）加 100-300 μ l HRP 的显色底物（四甲基联苯胺，TMB），避光显色 5-15 分钟，TPBS 洗涤 2-5 次，每次 2-5 分钟，（10）加 40-300 μ l 2N H₂SO₄终止反应，（11）在酶标仪 A450nm 波长处测定吸光值。
3. 根据权利要求 1 所述的早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白 G 糖基化

检测试剂及检测方法，其特征在于：(1) 所述酶标板（条）的每孔用溶于碳酸盐缓冲液（pH9.6）中的一种特异结合 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的蘑菇凝集素包被，浓度为 0.05-20 μ g/ml，体积为 150-400 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜，(2) 用 0.01-0.1% TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-30 分钟，(3) 加入 200-500 μ l 1-3% 牛血清白蛋白 BSA-TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜，(4) 用 TPBS 洗酶标板（条）2-4 次，每次 3-10 分钟，(5) 加入待测体液 50-300 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟—1 小时，(6) TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-20 分钟，(7) 加 100-300 μ l 碱性磷酸酶标记的 IgG 抗体（1:500-2000），温育 10-30 分钟，(8) TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-20 分钟，(9) 加 100-300 μ l 碱性磷酸酶标记的显色底物（对-硝基苯磷酸酯，p-NPP），避光显色 5-15 分钟，TPBS 洗涤 2-5 次，每次 2-5 分钟，(10) 加 40-300 μ l 1N NaOH 溶液终止反应，(11) 在酶标仪 A405nm 波长处测定吸光值。

4. 根据权利要求 2 和 3 所述的早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白 G 糖基化检测试剂及检测方法，其特征在于：(1) 采用权利要求 2 的方法测定含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化的吸光值，(2) 采用权利要求 3 的方法测定去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的吸光值，(3) 计算步骤 (2) 获得的检测值/步骤 (1) 获得的检测值的比值。

一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白 G 糖基化检测试剂及制备方法

技术领域 本发明涉及一种诊断类风湿关节炎的检测试剂及制备方法。

背景技术 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA) 是以关节进展性破坏为主, 并累及其他多种脏器的常见病。其发病率可高达 5%。RA 的病情特点为反复发作, 呈进展性加重, 如从关节晨僵、红肿到关节破坏, 及使病人丧失活动能力等。类风湿关节炎被称为“不死的癌症”, 它给病人带来了极大的身心痛苦和经济负担。类风湿关节炎如能在早期予以正确诊断并合理治疗, 病情将可得到缓解或趋于稳定。目前类风湿关节炎现常用的诊断方法有实验室检测和 X-光片方法等。其中实验室检测方法主要包括 IgG、类风湿因子 (RF)、血沉、C-反应蛋白测定等。但是这些方法各有不足之处: IgG 测定是病人血中总 IgG 水平的测定, 不同人 IgG 水平变化范围较大, 且免疫功能低下的病人并不伴有 IgG 升高; 血沉和 C-反应蛋白是反映病情活动期的一个指标, 在多种疾病可有不同程度的升高, 如结核、血液病和炎症等; 类风湿因子出现较晚, 并且仅有 30-40%的病人为阳性, 并同时受总 IgG 水平的影响; X-光片诊断是依据骨关节密度等诊断类风湿关节炎的指标, 当类风湿关节炎病人出现骨改变时有意义, 它也是一个较晚期出现的指标。

发明内容 本发明的目的在于提供一种特异灵敏且指标与发病机制直接相关的一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白 G 糖基化检测试剂及制备方法。本发明主要是利用糖与凝集素及抗原与抗体的特异结合, 偶联 IgG 分子中的糖链和蛋白链进行测定, 即通过含有 N-连接糖链的 IgG 分子糖基化水平的凝集素-亲和免疫测定诊断类风湿关节炎的一种试剂及制备方法。

本发明的技术方案概括如下:

利用凝集素-亲和免疫方法主要为：选择特异结合 IgG 半乳糖糖链末端的凝集素或去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的凝集素包被酶标板，BSA 封闭、加入待测样品、加入标记 IgG 抗体、显色和分析、酶标仪检测等。通过对病人体液（血清或关节滑液等）含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化降低的测定，或去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的 IgG 糖基化增加的测定，诊断类风湿关节炎；双重测定 IgG 糖基化的变化，即平行测定含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化的降低，和去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的 IgG 糖基化的增加，根据两测定比值来判断 IgG 的糖基化异常。

本发明的具体方案如下：

一、检测含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化变化（降低）的试剂及制备方法

（一）试剂：主要包括有花生凝集素（PNA）包被酶标板（条）、洗涤液吐温（Tween）20 - PBS（TPBS）、牛血清白蛋白（BSA）-TPBS 封闭液、辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG 抗体、显色底物（四甲基联苯胺, TMB）、反应终止液 H_2SO_4 。

（二）制备方法

1. 用特异结合 IgG 半乳糖糖链末端的凝集素，花生凝集素（PNA）包被酶标板（条），浓度为 0.05-20 μ g/ml（溶于碳酸盐缓冲液中，pH9.6），体积为 150-400 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜。
2. 用洗涤液 0.01-0.1%吐温（Tween）20-PBS（TPBS）洗酶标板（条）2-5 次，每次 5-30 分钟。洗涤过程中同时振摇（以下洗涤同）。
3. 加 200-500 μ l 1-3%牛血清白蛋白（BSA）-TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜。
4. 用 TPBS 洗酶标板（条）2-4 次，每次 3-10 分钟。

5. 每孔加待测体液（或对照）样品 50-300 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。
6. 用 TPBS 洗涤 2-5 次, 每次 5-20 分钟。
7. 加 100-300 μ l 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人 IgG 抗体 (1:400-3000 稀释), 温育 10-30 分钟。
8. 用 TPBS 洗涤 2-5 次, 每次 5-20 分钟。
9. 加 100-300 μ l HRP 的显色底物 (四甲基联苯胺, TMB), 避光显色 5-15 分钟。用 TPBS 洗涤 2-5 次, 每次 2-5 分钟。
10. 加反应终止液 40-300 μ l 2N H₂SO₄ 终止反应。
11. 在酶标仪 A450nm 波长处检测反应孔的吸光值, 正常值范围: 0.60-0.80。

二、检测去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的 IgG 糖基化变化 (增加) 的试剂及方法

(一) 试剂: 主要包括有蘑菇凝集素 (PVL) 包被酶标板 (条)、洗涤液吐温 (Tween) 20 -PBS (TPBS)、牛血清白蛋白 (BSA) -TPBS 封闭液、碱性磷酸酶标记的鼠抗人 IgG 抗体、碱性磷酸酶的显色底物 (对-硝基苯磷酸酯, p-NPP)、反应终止液 NaOH。

(二) 制备方法

1. 用特异结合去半乳糖后所暴露的糖链末端 (GlcNAc) 的凝集素, 蘑菇凝集素 (PVL) 包被酶标板 (条), 浓度为 0.05-20 μ g/ml (溶于碳酸盐缓冲液中, pH9.6), 体积为 150-400 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜。
2. 用洗涤液 0.01-0.1% 吐温 (Tween) 20 -PBS (TPBS) 洗酶标板 (条) 2-4 次, 每次 5-30 分钟。洗涤过程中同时振摇 (以下洗涤同)。
3. 加 200-500 μ l 1-3% 牛血清白蛋白 BSA-TPBS 封闭液, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

4. TPBS 洗酶标板（条）洗 2-4 次，每次 3-10 分钟。
 5. 加入待测体液（或对照）样品 50-300 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟-1 小时，或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
 6. 用 TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-20 分钟。
 7. 加 100-300 μ l 碱性磷酸酶（AKP）标记的鼠抗人 IgG 抗体（1:500-2000 稀释），温育 10-30 分钟。
 8. 用 TPBS 洗涤 2-5 次，每次 5-20 分钟。
 9. 加 100-300 μ l 碱性磷酸酶的显色底物（对-硝基苯磷酸酯，p-NPP），避光显色 5-15 分钟。
- 用 TPBS 洗涤 2-5 次，每次 2-5 分钟。
10. 加反应终止液 40-300 μ l 1N NaOH 溶液终止反应。
 11. 在酶标仪 A405nm 波长处检测吸光值，正常值范围：0.20-0.30。

三、IgG 分子糖基化双重检测的试剂及制备方法

- 1、与检测含半乳糖末端糖链的 IgG 糖基化变化（降低）的试剂及制备方法相同（略）。
- 2、与检测去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺次末端糖链的 IgG 糖基化变化（增加）的试剂及方法相同（略）。
- 3、 计算步骤 2 的检测值/步骤 1 的检测值的比值，正常值范围：2.0-4.0。

大量研究表明：RA 病人 IgG 分子的糖链结构发生改变，每分子 IgG 含有两条结合于重链 Fc 段 CH2 结构域的 N-连接糖链，与蛋白（肽链）的连接位点为 Asn297，多数 IgG 分子的糖链成双天线结构。根据 N-糖链双天线末端糖基组成差别，IgG 分子可分为三种糖型（glycoforms）：IgG2 糖形（正常糖链）

其两个双天线末端上有半乳糖，IgG1 糖形（异常糖链）其一个双天线末端缺失半乳糖及 IgG0 糖形（异常糖链）其两个双天线末端均缺失半乳糖），见附图 1。依据类风湿关节炎发病中 IgG 糖蛋白分子中的糖链结构功能变化的糖分子病理学机制，利用糖链特异结合的凝集素 1 及抗 IgG 特异抗体 2，通过对 IgG 的糖链 3 和蛋白质（肽）链 4 双夹心检测，测定糖基化改变（低半乳糖化）的 IgG 水平，见附图 2，如含半乳糖（Gal）末端糖链的 IgG 糖基化的减低，或去半乳糖后所暴露的 N-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）次末端糖链的 IgG 的增加均反映 IgG 的低半乳糖化异常，根据检测结果可辅助诊断类风湿关节炎。

本发明相比现有技术具有如下优点：

- 1、 灵敏特异、客观可靠、简单快速。
- 2、 糖基化异常的 IgG 在 RA 发病初期可检测到，并可先于 RA 临床症状前出现，与确诊的 RA 病例符合率高，在 80-90%，优于现有的一些临床检查指标，可提高 IgG 早期确诊率，减少 RA 给病人带来的身心痛苦和经济负担。
- 3、 本发明不仅可用于 类风湿关节炎的早期诊断，还可作为 RA 病人病情进展、疗效观察判断的辅助指标，对临床治疗有指导意义。

附图说明：

图1是本发明正常及异常IgG糖链结构示意图。

图2是本发明IgG糖基化的凝集素-亲和免疫检测原理图。

具体实施方式

例 1

用特异结合 IgG 半乳糖糖链末端的凝集素花生凝集素（PNA）包被酶标板，浓度为 0.05 μ g/ml（溶于碳酸钠缓冲液中，pH9.6），150 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 过夜。用洗涤液 0.01%吐温（Tween） 20-PBS（TPBS）洗酶标板 2 次，每次 30 分钟。

洗涤过程中同时振摇（以下洗涤同）。加 200 μ l 3%牛血清白蛋白（BSA）-TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜。用 TPBS 洗酶标板 2 次，每次 10 分钟。孔中分别加病人待测血清或 IgG 标准品（10ng）样品 300 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 20 分钟。加 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG 抗体（1:500 稀释, Sigma），温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 20 分钟。加 100 μ l HRP 的显色底物（四甲基联苯胺, TMB），避光显色 15 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 5 分钟。加反应终止液 40 μ l 2N H₂SO₄ 终止反应。在酶标仪 A450nm 波长处分别检测 IgG 标准品及待测血清反应孔的吸光值，检测结果：IgG 标准品的吸光值为 0.70，待测血清的吸光值为 0.35。

例 2

用特异结合 IgG 半乳糖糖链末端的凝集素花生凝集素（PNA）包被酶标板，浓度为 20 μ g/ml（溶于碳酸钠缓冲液中，pH9.6），400 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 过夜。用洗涤液 0.1%吐温（Tween）20-PBS（TPBS）洗酶标板 5 次，每次 5 分钟。洗涤过程中同时振摇（以下洗涤同）。加 500 μ l 1%牛血清白蛋白（BSA）-TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜。用 TPBS 洗酶标板 4 次，每次 3 分钟。孔中分别加病人待测关节滑膜液或 IgG 标准品（10ng）样品 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。用 TPBS 洗涤 5 次，每次 5 分钟。加 300 μ l 辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG 抗体（1:500 稀释, Sigma），温育 30 分钟。用 TPBS 洗涤 5 次，每次 5 分钟。加 300 μ l HRP 的显色底物（四甲基联苯胺, TMB），避光显色 5 分钟。用 TPBS 洗涤 5 次，每次 2 分钟。加反应终止液 300 μ l 2N H₂SO₄ 终止反应。在酶标仪 A450nm 波长处分别检测 IgG 标准品及待测血清反应孔的吸光值，检测结果：IgG 标准品的吸光值为 0.70，待测关节滑膜液的吸光值为 0.20。

例3

用特异结合去半乳糖后所暴露的糖链末端 (GlcNAc) 的蘑菇凝集素 (PVL) 包被酶标板, 浓度为 $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ (溶于碳酸钠缓冲液中, pH9.6, $150\mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 过夜。用洗涤液 0.01%吐温 (Tween) 20 - PBS (TPBS) 洗酶标板 2 次, 每次 30 分钟。洗涤过程中同时振摇 (以下洗涤同)。加 $200\mu\text{l}$ 3% 牛血清白蛋白 BSA-TPBS 封闭液, 4°C 过夜。TPBS 洗酶标板洗 4 次, 每次 3 分钟。孔中分别加病人待测血清或阳性对照 (10ng) 样品 $300\mu\text{l}$, 37°C 温育 1 小时。用 TPBS 洗涤 5 次, 每次 5 分钟。加 $100\mu\text{l}$ 碱性磷酸酶标记的鼠抗人 IgG 抗体 (1:500 稀释, Sigma), 温育 30 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次, 每次 20 分钟。加 $100\mu\text{l}$ 碱性磷酸酶的显色底物 (对-硝基苯磷酸酯, p-NPP), 避光显色 15 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次, 每次 5 分钟。加反应终止液 $40\mu\text{l}$ 1N NaOH 溶液终止反应。在酶标仪 A405nm 波长处分别检测 IgG 阳性对照及待测血清反应孔的吸光值, 检测结果: IgG 阳性对照的吸光值为 0.25, 待测血清的吸光值为 0.55。

例4

用特异结合去半乳糖后所暴露的糖链末端 (GlcNAc) 的蘑菇凝集素 (PVL) 包被酶标板, 浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ (溶于碳酸钠缓冲液中, pH9.6, $400\mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 过夜。用洗涤液 0.1%吐温 (Tween) 20 - PBS (TPBS) 洗酶标板 5 次, 每次 5 分钟。洗涤过程中同时振摇 (以下洗涤同)。加 $500\mu\text{l}$ 1% 牛血清白蛋白 BSA-TPBS 封闭液, 4°C 过夜。TPBS 洗酶标板洗 2 次, 每次 10 分钟。孔中分别加病人待测关节滑膜液或阳性对照 (10ng) 样品 $50\mu\text{l}$, 37°C 温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次, 每次 20 分钟。加 $300\mu\text{l}$ 碱性磷酸酶标记的鼠抗人 IgG 抗体 (1:2000 稀释, Sigma), 温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 5 次, 每次 5 分钟。加 $300\mu\text{l}$ 碱性磷酸酶的显色底物 (对-硝基苯磷酸酯, p-NPP), 避光显色 5 分钟。

用 TPBS 洗涤 5 次，每次 2 分钟。加反应终止液 300 μ l 1N NaOH 溶液终止反应。在酶标仪 A405nm 波长处分别检测 IgG 阳性对照及待测关节滑膜液反应孔的吸光值，检测结果：IgG 阳性对照 的吸光值为 0.25，待测关节滑膜的吸光值为 0.60。

例5

1. 用特异结合 IgG 半乳糖糖链末端的凝集素花生凝集素 (PNA) 包被酶标板，浓度为 0.5 μ g/ml (溶于碳酸钠缓冲液中，pH9.6)，300 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 过夜。用洗涤液 0.05%吐温 (Tween) 20-PBS (TPBS) 洗酶标板 2 次，每次 5 分钟。洗涤过程中同时振摇 (以下洗涤同)。加 400 μ l 3%牛血清白蛋白 (BSA) -TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜。用 TPBS 洗酶标板 2 次，每次 10 分钟。孔中分别加病人待测血清或 IgG 标准品 (10ng) 样品 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 20 分钟。加 200 μ l 辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG 抗体 (1:500 稀释, Sigma)，温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 20 分钟。加 200 μ l HRP 的显色底物 (四甲基联苯胺, TMB)，避光显色 15 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 2 分钟。加反应终止液 40 μ l 2N H₂SO₄ 终止反应。在酶标仪 A450nm 波长处分别检测 IgG 标准品及待测血清反应孔的吸光值，检测结果：IgG 标准品的吸光值为 0.70，待测血清的吸光值为 0.40。

2. 用特异结合去半乳糖后所暴露的糖链末端(GlcNAc)的蘑菇凝集素(PVL) 包被酶标板，浓度为 20 μ g/ml (溶于碳酸钠缓冲液中，pH9.6，300 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 过夜。用洗涤液 0.05%吐温 (Tween) 20 - PBS (TPBS) 洗酶标板 2 次，每次 5 分钟。洗涤过程中同时振摇 (以下洗涤同)。加 400 μ l 1% 牛血清白蛋白 BSA-TPBS 封闭液，4 $^{\circ}$ C 过夜。TPBS 洗酶标板洗 2 次，每次 10 分钟。孔中分别加病人待测血清或阳性对照 (10ng) 样品 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。用 TPBS

洗涤 3 次, 每次 10 分钟。加 200 μ l 碱性磷酸酶标记的鼠抗人 IgG 抗体(1:2000 稀释, Sigma), 温育 20 分钟。用 TPBS 洗涤 3 次, 每次 10 分钟。加 300 μ l 碱性磷酸酶的显色底物(对-硝基苯磷酸酯, p-NPP), 避光显色 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次, 每次 2 分钟。加反应终止液 50 μ l 1N NaOH 溶液终止反应。在酶标仪 A405nm 波长处分别检测 IgG 阳性对照及待测血清反应孔的吸光值, 检测结果: IgG 阳性对照 的吸光值为 0.25, 待测血清的吸光值为 0.65。

3. 以上酶标仪 A405nm 和 A450nm 吸光值的检测值的比值分别是: IgG 阳性对照为 2.8, 待测血清为 0.61。

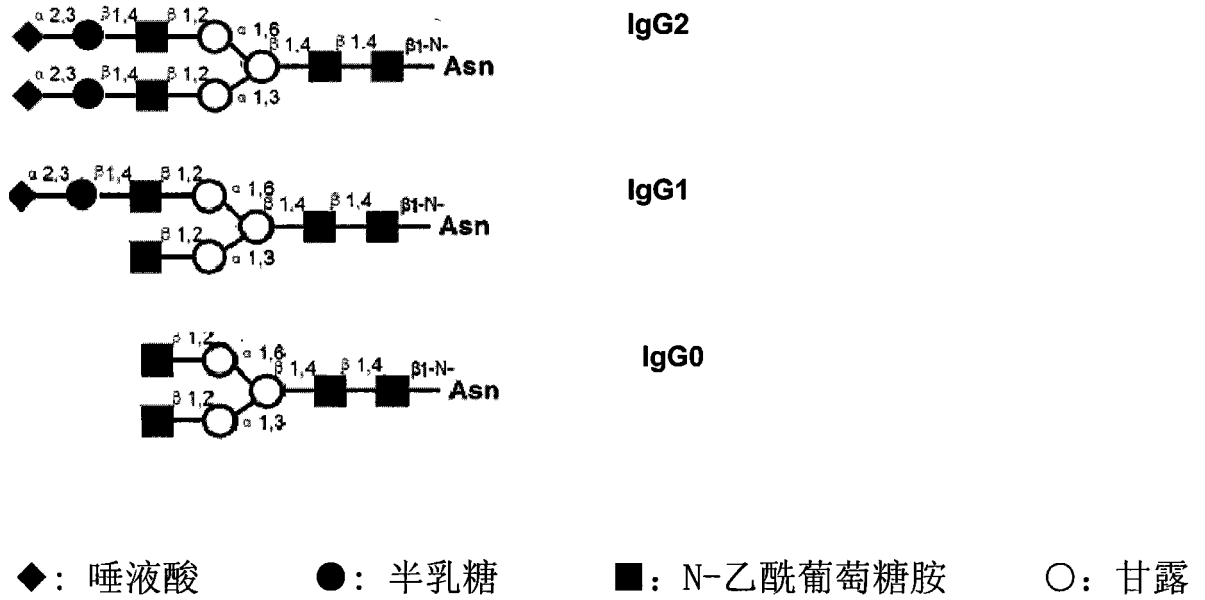
例6

1. 用特异结合 IgG 半乳糖糖链末端的凝集素花生凝集素(PNA)包被酶标板, 浓度为 0.5 μ g/ml (溶于碳酸钠缓冲液中, pH9.6), 300 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用洗涤液 0.05%吐温(Tween) 20-PBS (TPBS) 洗酶标板 2 次, 每次 5 分钟。洗涤过程中同时振摇(以下洗涤同)。加 400 μ l 3%牛血清白蛋白(BSA)-TPBS 封闭液, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 TPBS 洗酶标板 2 次, 每次 10 分钟。孔中分别加病人待测关节滑膜液或 IgG 标准品(10ng)样品 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 3 次, 每次 10 分钟。加 200 μ l 辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG 抗体(1:500 稀释, Sigma), 温育 20 分钟。用 TPBS 洗涤 3 次, 每次 10 分钟。加 200 μ l HRP 的显色底物(四甲基联苯胺, TMB), 避光显色 15 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次, 每次 2 分钟。加反应终止液 50 μ l 2N H₂SO₄ 终止反应。在酶标仪 A450nm 波长处分别检测 IgG 标准品及待测血清反应孔的吸光值, 检测结果: IgG 标准品的吸光值为 0.70, 待测血清的吸光值为 0.30。

2. 用特异结合去半乳糖后所暴露的糖链末端(GlcNAc)的蘑菇凝集素(PVL)包被酶标板, 浓度为 20 μ g/ml (溶于碳酸钠缓冲液中, pH9.6, 300 μ l/

孔，4℃过夜。用洗涤液 0.05%吐温 (Tween) 20 - PBS (TPBS) 洗酶标板 2 次，每次 5 分钟。洗涤过程中同时振摇 (以下洗涤同)。加 400μl 1% 牛血清白蛋白 BSA-TPBS 封闭液，4℃过夜。TPBS 洗酶标板洗 2 次，每次 10 分钟。孔中分别加病人待测关节滑膜液或阳性对照 (10ng) 样品 50μl，37℃温育 10 分钟。用 TPBS 洗涤 3 次，每次 10 分钟。加 200μl 碱性磷酸酶标记的鼠抗人 IgG 抗体 (1:2000 稀释, Sigma)，温育 20 分钟。用 TPBS 洗涤 3 次，每次 10 分钟。加 300μl 碱性磷酸酶的显色底物 (对-硝基苯磷酸酯, p-NPP)，避光显色 10 分钟。用 TPBS 洗涤 2 次，每次 2 分钟。加反应终止液 50μl 1N NaOH 溶液终止反应。在酶标仪 A405nm 波长处分别检测 IgG 阳性对照及待测关节滑膜液反应孔的吸光值，检测结果：IgG 阳性对照 的吸光值为 0.25，待测关节滑膜液的吸光值为 0.70。

3. 以上酶标仪 A405nm 和 A450nm 吸光值的检测值的比值分别是：阳性对照为 2.8，待测关节滑膜液为 0.43。



糖

图 1

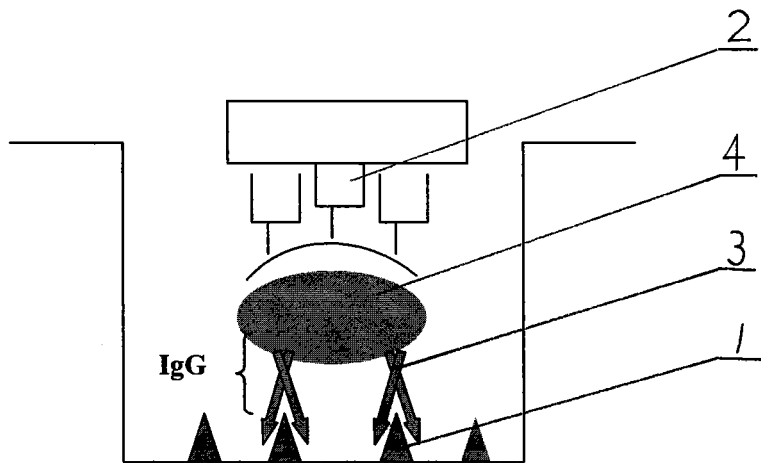


图 2

专利名称(译)	一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白G糖基化检测试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN101074951A	公开(公告)日	2007-11-21
申请号	CN200710011899.7	申请日	2007-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	大连医科大学		
申请(专利权)人(译)	大连医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连医科大学		
[标]发明人	燕秋 富力 朱正美 张文利 马悦 王晓琦		
发明人	燕秋 富力 朱正美 张文利 马悦 王晓琦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	王发		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 一种早期诊断类风湿关节炎的免疫球蛋白G糖基化检测试剂及检测方法，其主要是：用与糖链特异结合的凝集素及标记的IgG抗体，对IgG的糖基化进行凝集素—亲和免疫检测，其包括测定含半乳糖末端糖链的IgG糖基化的降低，测定去半乳糖后所暴露的N - 乙酰葡萄糖胺次末端糖链的IgG增加，双重测定IgG糖基化的变化即同时测定含半乳糖末端糖链的IgG糖基化的降低和N - 乙酰葡萄糖胺次末端糖链的IgG糖基化的增加，并计算两者测定的比值。本发明灵敏特异、客观可靠、简单快速；与确诊的RA病例符合率高，在80 - 90%，优于现有的一些临床检查指标，可提高IgG早期确诊率。

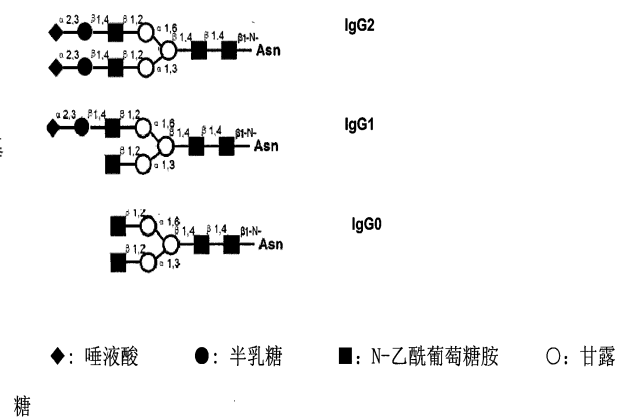


图 1