



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110346576 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201910244501.7

(22)申请日 2019.03.28

(66)本国优先权数据

201810279792.9 2018.04.01 CN

(71)申请人 英诺诊断有限公司

地址 中国香港沙田区香港沙田科学园,科技大道西11号,生物科技中心2座5楼

(72)发明人 徐爱民 钟铃 韩灏 凯·基恩

周鹏程 左陪军

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

代理人 王卫彬 吕学辰

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54)发明名称

一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途。所述的抗原固定化基质膜包含但不仅包含以下22条彼此独立的抗原检测线,所述的抗原检测线由双链DNA、组蛋白、核糖体P0蛋白、PCNA、SmD1、SmD3、SmB/B'、snRNP-A、snRNP-C、snRNP68/70、SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La、Jo-1、PL-7、PL-12、PmSc1、Sc1-70、CENP-A、CENP-B、RA33以及PR3组成。利用包含该抗原固定化基质膜的试剂盒进行检测,能够同时检测22种自身免疫抗体,用以辅助诊断8种常见弥漫性结缔组织病。

1. 一种抗原固定化基质膜,其特征在于,包含但不仅包含以下22条彼此独立的抗原检测线,所述的抗原检测线由双链DNA、组蛋白、核糖体P0蛋白、PCNA、SmD1、SmD3、SmB/B'、snRNP-A、snRNP-C、snRNP68/70、SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La、Jo-1、PL-7、PL-12、PmSc1、Sc1-70、CENP-A、CENP-B、RA33以及PR3组成。

2. 如权利要求1所述的抗原固定化基质膜,其特征在于,所述抗原固定化基质膜为硝酸纤维膜或尼龙膜;所述抗原检测线平行设置;

和/或,所述组蛋白、所述核糖体P0蛋白、所述snRNP68/70、所述PCNA、所述SmD1、所述SmD3、所述SmB/B'、所述snRNP-A、所述snRNP-C、所述SSA/Ro52、所述SSB/La、所述Jo-1、所述PL-7、所述PL-12、所述Sc1-70、所述CENP-A、所述CENP-B、所述SSA/Ro60、所述PmSc1-75、所述RA33及所述PR3是利用哺乳动物细胞系统表达获得,所述哺乳动物细胞为HEK293细胞。

3. 一种检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒,其特征在于,其包括如权利要求1或2所述的抗原固定化基质膜。

4. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述的抗原固定化基质膜为免疫印迹法用抗原固定化基质膜;较佳地,所述的试剂盒还包括用于固定所述抗原固定化基质膜的支撑载体、酶联试剂、显色底物、样本稀释液、浓缩洗涤液和反应终止液,所述支撑载体与所述抗原固定化基质膜组成反应膜条。

5. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,抗原固定化基质膜上还包被有三条质控带:浓度为35-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的高浓度质控带、浓度为15-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的中浓度质控带以及浓度为0.5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的低浓度质控带,较佳地,所述质控带由纯化后的人源IgG划线而成;

和/或,所述抗原固定化基质膜上还包被有阴性对照。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述阴性对照为已剥除IgG的人类血清。

7. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述抗原固定化基质膜上还包被有反应起始线,所述的反应起始线较佳地为辣根过氧化物酶。

8. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述酶联试剂为辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG;

所述显色底物为5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐与四唑硝基蓝底物组合(BCIP/NBT)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

所述样本稀释液为含有10%BSA的1 \times TBST缓冲液;

所述浓缩洗涤液为20 \times TBST缓冲液;

和/或,所述反应终止液为0.1M/L硫酸。

9. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述的自身免疫疾病为弥散性结缔组织病,所述的弥散性结缔组织病较佳地为系统性红斑狼疮、干燥综合征、混合型结缔组织病、皮炎/多肌炎、系统性硬化症、局限性硬皮病、风湿性关节炎和韦格纳肉芽肿中的一种或多种;

和/或,所述的试剂盒还带有反应孵育盘,所述反应孵育盘为具有独立半封闭凹槽的塑料孵育盘;所述的独立半封闭凹槽的数量较佳地为10个。

10. 一种如权利要求1或2所述的抗原固定化基质膜,或者如权利要求3~9任一项所述的试剂盒在检测自身免疫疾病中的用途;所述的自身免疫疾病优选为弥散性结缔组织病,所述的弥散性结缔组织病优选为系统性红斑狼疮、干燥综合征、混合型结缔组织病、皮肤

炎/多肌炎、系统性硬化症、局限性硬皮病、风湿性关节炎和韦格纳肉芽肿中的一种或多种。

一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] 自身免疫性疾病 (Autoimmune Diseases) 是由于机体免疫系统对自身存在的抗原发生免疫反应,进而导致自身器官组织损害的一类疾病。其发病过程涉及自身抗原的暴露、机体促炎症的微环境、先天免疫系统的激活、抗原呈递反应激活获得性免疫系统、T细胞的激活以及B细胞释放出大量抗自身抗体等等病理机制。随着免疫系统的层级紊乱和对释放自身抗原的组织或器官的进一步攻击和损害,最终导致器质性病变,亦即自身免疫性疾病的发生。

[0003] 基于自身免疫类疾病的特殊病理机制可知,自身免疫反应的发生早于该疾病临床表征的出现。不同的自身免疫性疾病,致病性自身抗原的种类各异,故B细胞所产生的抗自身抗原的抗体也具有疾病特异性。因此,检测血液中的特异性自身抗体,就成为对自免类疾病进行风险预测、早期诊断的重要免疫学指标。

[0004] 自身免疫性疾病可发于人体的任何器官及组织。至今,已临床发现超过100种不同的自免类疾病。根据世界卫生组织 (World Health Organization,WHO) 的权威报道,自身免疫性疾病在人群中的发病率约占总人数的3-5%。在中国,罹患此类疾病的患者数目高达6000万人以上。自身免疫性疾病好发于女性和中老年人,其特点是起病缓慢,病程反复迁徙,反复发作,反复缓解,有的成为终生痼疾。

[0005] 目前临床实验室使用的自身抗体免疫学检测方法包括免疫荧光法、酶联免疫吸附法和免疫印迹法,不同方法各有优劣。

[0006] 免疫荧光法是使用具有完全自身抗原谱的人喉癌上皮细胞Hep-2或鼠肝或鼠肾的细胞冰冻切片为基质。加入血清检测时,血清中的自免抗体可特异性结合于天然抗原上,再通过荧光染色的方法提示自身抗体的存在,属于定性的检测方法。根据抗体所结合的自身抗原的亚细胞定位,其染色图谱可大致分为:均质核型、着丝点核型、核膜核型、核仁核型、斑点核型以及胞浆型六大类。

[0007] 这种方法的优点是利用细胞所含的天然抗原进行自身抗体检测,抗原谱完全,且抗原结构均为天然构像,其检测的特异性最高。缺点是操作复杂,且定性结果判定具有主观性,可能因为疾病进程的不同、观察者的不同以及新老切片批次不同的差异而对染色结果释义存在差异。同时,该方法无法通过荧光图谱确定阳性自身抗体的具体种类,因此无法对不同种类的疾病进行特异性鉴别诊断。

[0008] 酶联免疫吸附法是将某一特定种类的自身抗原吸附于酶标板上。孵育血清后,抗原与血清中自身抗体特异性结合,再通过酶联反应显色的一种定量检测手段。它具有灵敏度高、特异性强、操作方法简便、应用范围广等特点。同时,可针对单类自免抗体进行特异性

定量检测,排除了诊断结果释义中的主观偏差。但是,单次酶联免疫测试只能检测单一的自身抗体,检测通量低成本高,在自身免疫性疾病的辅助诊断应用推广方面具有很大的局限性。

[0009] 免疫印迹法是基于固相免疫测定技术的一种检测方法。其原理是通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将HEP-2细胞裂解物进行电泳分离,进而确定不同的自身抗原在电泳图谱上的位置,再通过电转移的方式将完全抗原谱从凝胶转移至硝酸纤维素膜或尼龙膜。孵育血清后,血清中的自身抗体与固相膜上的抗原进行特异性结合,再通过不同的信号检测方式,如碱性磷酸酶显色或化学发光等,对自身抗体进行半定量或定量检测。

[0010] 固相免疫测定技术本身具有高特异性和高敏感性的优点。但凝胶电泳分离技术只可通过分子量大小粗略分离抗原,无法精确定位不同抗原在膜上的位置,对于检出抗体的具体种类的判别具有主观性。同时,该技术也无法排除非抗原蛋白的存在,因此无法判别阳性检出信号是特异性还是非特异性的结果。另外,在凝胶电泳过程中,十二烷基磺酸钠等变性剂的加入会不同程度地破坏抗原决定簇的天然构像,导致无法识别特异性自身抗体或发生非特异性结合,造成假阳性或假阴性结果,影响后续诊断。

[0011] 随着蛋白工程技术的发展,免疫印迹法得到了进一步的改良。通过不同的蛋白表达系统,可表达纯化得到特定的高纯度重组抗原蛋白,再通过点样或划线的方法,将重组抗原包被于硝酸纤维素膜或尼龙膜的某一确定位置,进而对特异性自身抗体进行检测。改进后的免疫印迹法避免了天然抗原被变性及构像破坏,并可根据不同抗原在膜上的准确位置精准判读检出的自身抗体种类。

[0012] 弥散性结缔组织病泛指就诊于风湿免疫科的一大类自身免疫疾病的集合,是以疏松结缔组织黏液样水肿及纤维蛋白样变性为病理基础的一组疾病。其中包括系统性红斑狼疮、干燥综合征、混合型结缔组织病、皮炎、多肌炎、硬皮病、风湿性关节炎、韦格纳肉芽肿等。此组疾病包含多种临床及病理学方面的共同点,如多系统同时受累(皮肤、肌肉、关节、心脏、肾脏、造血系统、中枢神经系统等),可伴发热、关节痛、雷诺现象、血管炎、血沉增快、 γ 免疫球蛋白增高等表象,且病程长变化多;但又各具有特征性的表现。该类疾病的致病性抗原多为细胞核内蛋白,故所产生的自身抗体多为抗核抗体。由于该类疾病发病机制上的内部相关性,常出现多种疾病伴随发生的重叠现象。由于特征性临床表象多在病程中晚期才逐渐出现,针对特异性抗核抗体的免疫学检测就成为该类疾病早期诊断的有力工具。

[0013] 根据中华医学会风湿病学分会的诊治指南,不同的弥散性结缔组织病可使用各自特异的一种或几种抗核抗体作为诊断指标或辅助性诊断指标。例如,检出阳性的抗dsDNA,抗SmD1、抗SmD3、抗SmB/B'、抗组蛋白(H2A、H2B、H3以及H4)、抗核糖体P蛋白、抗增殖细胞核抗原等自身抗体是诊断系统性红斑狼疮的免疫学指标;阳性抗SSA/Ro60、抗SSA/Ro52、抗SSB/La等抗体为干燥综合征的诊断指标;抗snRNPA、抗snRNPC和抗snRNP68/70等抗体为混合型结缔组织病诊断指标;抗Jo-1、抗PL-7、抗PL-12及抗PmSc1等抗体阳性为皮炎多肌炎的辅助诊断指标;抗Sc1-70等1种抗体为系统性硬化症指标;抗CENP-A及抗CENP-B等抗体为局限性硬皮病指标;抗RA33、抗CCP、抗RF等抗体为风湿性关节炎特异性指标;抗PR3、抗MPO等抗体为韦格纳肉芽肿的免疫学指标。

[0014] 但由于多种弥散性结缔组织病之间发病机理相互关联,血清免疫学诊断指标的运用也相较其他类型疾病更为复杂,例如:1)不同抗核抗体在同种疾病中的阳性率有所不同,

如抗Jo-1抗体在肌炎病人中阳性率仅为10-30%，因此需要增加检测如抗PL-7和抗PL-12等自身抗体，利用多种指标相互配合以增加肌炎的检出率；2) 不同疾病之间存在相互重叠的阳性抗核抗体，如抗dsDNA和抗Sm抗体为红斑狼疮的特异性标记物，但红斑狼疮患者血清亦常伴随出现阳性抗snRNP-A、-C及-68/70抗体；3) 同一病患可出现多种风湿类疾病伴随出现的重叠病症，如10%的肌炎患者可检出阳性的抗PmSc1抗体，其中一半患者多伴有硬皮病发生，而红斑狼疮患者常伴有继发性干燥综合征，因此检出阳性抗SSA (Ro52/Ro60) 和抗SSB抗体可有效提示继发性干燥综合征的发生；4) 某些检测指标可对病程发展有提示作用，如阳性抗snRNP类抗体的出现，则提示未来可能发生肺动脉高压的风险。

[0015] 虽然临床检验领域已经有少数可同时检测多种抗核抗体的免疫印迹产品，例如CN102937468A、CN101329341A以及等专利文献中均公开了包括利用重组技术获得的重组抗原的试剂盒，然而其包括的抗原种类最多仅为17种，所能检测的免疫疾病种类相对较低，且疾病诊断的准确率以及灵敏度低。

发明内容

[0016] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术当中的多抗核抗体检测谱所诊断的疾病种类不够全面、特异性和敏感度低以及操作复杂等缺陷，提供一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途，利用包含该抗原固定化基质膜的试剂盒能够同时检测22种自身免疫抗体，用以辅助诊断8种常见弥散性结缔组织病，且具有极高的特异性和灵敏度，本发明的包含能检测出至少22种自身免疫抗体的反应膜条的试剂盒在国内外尚属首例。

[0017] 如上所述，现有技术当中用于检测自身免疫疾病的方法存在诸多不足，鉴于此，本发明人付出创造性劳动后获得一种检测膜条，其集聚了22种具有辅助临床诊断意义的抗体检测，用于8大类重大自身免疫疾病的单个诊断、交叉检测、继发性疾病预测以及相关疾病的风险预测。

[0018] 本发明解决上述技术问题的技术方案之一为：一种抗原固定化基质膜，其包含但不仅包含以下22条彼此独立的抗原检测线，所述的抗原检测线由双链DNA、组蛋白、核糖体P0蛋白、PCNA、SmD1、SmD3、SmB/B'、snRNP-A、snRNP-C、snRNP68/70、SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La、Jo-1、PL-7、PL-12、PmSc1、Sc1-70、CENP-A、CENP-B、RA33以及PR3组成。

[0019] 其中，所述的抗原固定化基质膜可为本领域常规的抗原固定化基质膜，例如硝酸纤维膜或尼龙膜；所述抗原检测线平行设置。

[0020] 现有抗原固定化基质膜所使用的重组自身抗原，多来源于原核表达系统。由于二硫键形成体系和翻译后修饰体系在此表达系统中的缺失，所产生的重组抗原构像多与人体内的天然抗原构像有所差异，大大影响对自身抗体的特异性识别，进而造成诊断的敏感度与特异性降低。本发明中的所述组蛋白、所述核糖体P0蛋白、所述snRNP68/70、所述PCNA、所述SmD1、所述SmD3、所述SmB/B'、所述snRNP-A、所述snRNP-C、所述SSA/Ro52、所述SSB/La、所述Jo-1、所述PL-7、所述PL-12、所述Sc1-70、所述CENP-A、所述CENP-B、所述SSA/Ro60、所述PmSc1-75、所述RA33及所述PR3优选利用哺乳动物细胞系统表达获得，所述哺乳动物细胞为HEK293细胞。其中，本发明的组蛋白抗原线由4种不同的组蛋白H2A、H2B、H3以及H4的抗原组成。

[0021] 本发明解决上述技术问题的技术方案之二为：一种检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒，其包括上述抗原固定化基质膜。所述的抗原固定化基质膜优选为免疫印迹用抗原固定化基质膜；较佳地，所述的试剂盒还包括用于固定所述抗原固定化基质膜的支撑载体、酶联试剂、显色底物、样本稀释液、浓缩洗涤液和反应终止液，所述支撑载体与所述抗原固定化基质膜组成反应膜条。

[0022] 为了使结果判读更为直观准确，且可进行定量分析，所述的抗原固定化基质膜或者所述的尼龙膜上较佳地还包被有三条质控带：浓度为35-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的高浓度质控带、浓度为15-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的中浓度质控带以及浓度为0.5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的低浓度质控带所述质控带优选由纯化后的人源IgG划线而成。

[0023] 较佳地，所述抗原固定化基质膜还包被有阴性对照，所述阴性对照优选为已剥除IgG的人类血清。

[0024] 较佳地，所述抗原固定化基质膜还包被有反应起始线，所述的反应起始线优选为辣根过氧化物酶。

[0025] 较佳地，所述酶联试剂为辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG；所述显色底物为5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐与四唑硝基蓝底物组合(BCIP/NBT)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺；所述样本稀释液为含有10%BSA的1 \times TBST缓冲液；所述浓缩洗涤液为20 \times TBST缓冲液；所述反应终止液为0.1M/L硫酸。

[0026] 本发明中，所述的自身免疫疾病优选为弥漫性结缔组织病，所述的弥漫性结缔组织病较佳地为系统性红斑狼疮、干燥综合征、混合型结缔组织病、皮炎/多肌炎、系统性硬化症、局限性硬皮病、风湿性关节炎和韦格纳肉芽肿中的一种或多种。

[0027] 较佳地，所述的试剂盒还带有反应孵育盘，所述反应孵育盘为具有独立半封闭凹槽的塑料孵育盘；所述的独立半封闭凹槽的数量较佳地为10个。

[0028] 本发明解决上述技术问题的技术方案之三为：一种上述抗原固定化基质膜或者上述试剂盒在检测自身免疫疾病中的用途；所述的自身免疫疾病优选为弥漫性结缔组织病，所述的弥漫性结缔组织病优选为系统性红斑狼疮、干燥综合征、混合型结缔组织病、皮炎/多肌炎、系统性硬化症、局限性硬皮病、风湿性关节炎和韦格纳肉芽肿中的一种或多种。

[0029] 在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

[0030] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0031] 本发明的积极进步效果在于：

[0032] (1) 本发明的试剂盒能够同时检测22种自身免疫抗体，用以辅助诊断8种常见弥漫性结缔组织病，相较市场已有产品具有更高的特异性(表现形式为健康人和其他无关疾病中无任何假阳性检出)及高敏感度(疾病检出率超过市场同类型产品)；

[0033] (2) 配合本发明中单独表达的、更趋近于人体天然抗原蛋白构象的重组抗原，最大程度避免了非特异性抗体的结合，显著提高诊断结果的准确性；

[0034] (3) 反应膜条包括质控带、阴性对照线以及反应起始线时，使得结果判读更加直观准确、并能够进行定量分析；

[0035] (4) 本发明的试剂盒检测效率高，可以在室温30分钟内完成检测；

[0036] (5) 本发明的试剂盒包括反应孵育盘时，所述反应孵育盘的独立半封闭的设计可

以避免同时检测多个样品时返生交叉污染同时,独立多通道反应槽的设计,使得每个孵育盘可同时检测10种不同样本。

附图说明

[0037] 图1为试剂盒中反应膜条上质控带与抗原带分布示意图。

[0038] 图2为试剂盒中反应膜条截面示意图。

[0039] 图3A~G为本发明表达生产的类天然构象高纯度重组抗原蛋白。

[0040] 图4为干燥综合征病人血清使用现有市场产品(对照)抗核抗体谱检测17S-2-24T的检测结果显示图。

[0041] 图5为健康人及干燥综合征病人血清使用本发明试剂盒的检测结果显示图。

具体实施方式

[0042] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0043] 上述实施例中所使用的pcDNA3.1(+)质粒购于Invitrogen公司;DMEM培养基、胎牛血清FBS以及培养基所用抗生素PSF均购于Gibco公司;转染试剂JET-PEI购于PolyPlus公司;HEK293细胞购于美国典型培养物保藏中心(ATCC);Ni-NTA镍离子亲和柱购于Qiagen公司;离子交换柱购于GE公司。

[0044] 实施例1试剂盒的制备

[0045] 1、抗原的制备

[0046] 所有自身抗原蛋白均采用哺乳细胞表达系统进行重组蛋白表达。

[0047] 委托生物公司进行不同抗原的序列(Jo-1:Gene ID 3035;PL-7:Gene ID6897;PL-12:Gene ID 16;SnRNP-A:Gene ID 6627;SnRNP-C:Gene ID 6631;SnRNP68/70:Gene ID 6625;SmD1:Gene ID 6632;SmD3:Gene ID 6634;SmB/B':Gene ID 6628;dsDNA:PMID:6272877;H2A:Gene ID 92815;H2B:Gene ID 8349;H3:Gene ID 8350;H4:Gene ID 8359;PCNA:Gene ID 5111;P0:Gene ID 6175;SSA/Ro60:Gene ID 6738;SSA/Ro52:Gene ID 6737;SSB/La:Gene ID 6741;CENP-A:Gene ID 1058;CENP-B:Gene ID 1059;Sc1-70:Gene ID 7150;PmSc1-75:Gene ID 5393;RA33:Gene ID 3181;PR3:Gene ID 5657)合成并将所得序列克隆到pcDNA3.1(+)表达载体通过氨苄霉素(终浓度0.1mg/ml)对有抗性的阳性克隆子进行筛选,并从阳性菌株中提取阳性质粒DNA(详见分子克隆实验指南)。

[0048] 再使用转染试剂JET-PEI介导阳性克隆转染至HEK293细胞并使用G418抗生素对稳转细胞株进行抗性筛选,具体操作方法为:

[0049] 1)用100 μ l的300mM NaCl溶液稀释3 μ g的阳性质粒DNA;再用另外100 μ l 300mM NaCl溶液稀释6 μ l的JET-PEI试剂,于室温静置5分钟。

[0050] 2)充分混合上述两只稀释液,与室温静置25分钟。

[0051] 3)将混合液加入用DMEM细胞培养基(10%FBS,1%PSF)培养至 1×10^6 个细胞的6-孔细胞培养板中。

[0052] 4)转染24小时后,将正常细胞培养基换为含有终浓度为1mg/ml G418抗生素的

DMEM培养基。

[0053] 5) 每2-3天更换一次含有G418的新鲜培养基,约1个月后得到稳转细胞株。

[0054] 6) 通过蛋白免疫印迹法对稳转细胞株中特定抗原蛋白的表达水平进行鉴定。

[0055] 重组蛋白在稳转细胞株内持续高效表达,最终于HEK293细胞裂解物中得到重组蛋白。重组蛋白的N-端均带有6个组氨酸标签。

[0056] 对所得抗原的鉴定、纯化分离:

[0057] 优化表达条件后,依次使用镍离子亲和纯化柱-离子交换柱-透析等方法分离纯化重组蛋白,经SDS-PAGE鉴定,单个重组抗原纯度可达90%以上(见图3A~G)。纯化后的重组抗原蛋白均通过使用阴性及阳性标准血清进行临床验证。

[0058] 2、包被

[0059] 将自身抗原蛋白稀释于封闭液中(1%BSA溶于1×PBS溶液)至终浓度范围为100-500ng/μl,再采用全自动点样仪对膜条上的22条抗原带、3条质控带、1条阴性对照带及1条反应起始带进行点样包被及排序,点样仪喷射体积为1μl/cm²。

[0060] 具体如图1所示,其中用于划线的形式不局限于所表示的形式,各种抗原的排列顺序可以任意调整。

[0061] 3、包被完成后,将膜条置于封闭液中,于常温封闭1小时。封闭液组分为:1%牛血清白蛋白(BSA)溶于1×PBS溶液中。

[0062] 4、固定硝酸纤维膜

[0063] 将所制备的带有22种抗原的硝酸纤维膜固定在支撑载体上,得反应膜条,见图2。

[0064] 5、试剂盒的组装

[0065] 反应膜条20个、酶联试剂1×30ml、显色底物1×30ml、样本稀释液3×50ml、浓缩洗涤液1×50ml以及反应终止液1×40ml。

[0066] 实施例2试剂盒的使用方法

[0067] 样品准备:人血清或已加抗凝剂的血浆。样本保存于2-4℃,若24小时内不能测试,需保存样本至-20或-80℃。严重溶血、有絮状物或霉状物的标本会影响检测结果,不宜使用。

[0068] 洗涤液配制:用19份蒸馏水稀释1份20×浓缩洗涤液,混匀配制为标准洗涤液(需现配现用)。

[0069] (1) 将反应膜条放入反应孵育盘中一道半封闭独立反应凹槽,加入1ml标准洗涤液,轻轻晃动至彻底湿润膜条后,移弃稀释液。

[0070] (2) 用样本稀释液按照1(样本血清):250(稀释液)的比例稀释待检测样本,将1ml已稀释的样本加入膜条反应槽。

[0071] (3) 将孵育盘放于以60rpm/min速度轻轻摇动的摇床上,于室温(25度)孵育5分钟后,弃尽反应槽内样本。

[0072] (4) 加入2ml标准洗涤液于膜条反应槽,置于摇床室温轻摇,2分钟后弃除洗涤液,重复3次。

[0073] (5) 加入1ml酶联试剂,于室温孵育5分钟后,弃尽反应槽内样本。

[0074] (6) 重复步骤4。

[0075] (7) 加入1ml显色底物,置于摇床上,室温避光孵育5分钟后,弃尽底物溶液。

[0076] (8) 加入2ml蒸馏水洗涤膜条,摇床轻摇1分钟后弃除蒸馏水。

[0077] (9) 加入1ml反应终止液,室温静置1分钟,弃除终止液。

[0078] (10) 重复步骤8。

[0079] (11) 取出膜条,用吸水纸吸干残留液体。

[0080] 反应完成后,可根据目测、或扫描后借助相关定量判读软件如ImageJ、或使用全自动判读分析仪器如全自动凝胶成像分析仪对检测结果进行分析。通过与阴性对照线及3条质控线的结果进行比对,可判读自免抗体滴度为阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性或输出为量化的检测数值。

[0081] 效果实施例1

[0082] 使用本发明试剂盒与国内市场现有亚辉龙抗核抗体谱检测17S-2-24T(对照)分别对健康人血清及干燥综合征患者血清进行检测,可发现在健康血清中没有任何信号检出(无假阳性信号,即特异性高);在干燥综合征病人血清中,上述市场现有产品仅能检出微弱的抗SSA/Ro52抗体及抗snRNP抗体信号;而本发明试剂盒完全检出了此疾病的3个经典免疫学诊断指标,即抗SSA/Ro52,抗SSA/Ro60及抗SSB/La自免抗体,且信号强烈,灵敏度极高。同时,由于本发明试剂盒的高特异性及高灵敏度,还同时检出了阳性的抗Sc1-70、抗PmSc1、抗PL-7及抗snRNP68/70等自身抗体,提示病人可能存在继发性肌炎及系统性硬化症的可能性,需对疾病发展保持持续观察,以保证良好预后(图4、图5)。

[0083] 效果实施例2不同检测试剂对弥散性结缔组织自身免疫性疾病的检出率比较

[0084] 表1不同检测试剂对弥散性结缔组织自身免疫性疾病的检出率比较(超过200例临床样本统计结果)

[0085]

	红斑狼疮病人血样	混合型结缔组织病人血样	干燥综合征病人血样	局限性硬皮病/系统性硬化症病人血样	皮炎/多肌炎病人血样	健康人群血样
英诺诊断有限公司	82%	57%	50%	70%	50%	0%
欧蒙医学诊断有限公司	65%	57%	50%	60%	0%	0%
亚辉龙生物科技有限公司	98%	57%	38%	70%	0%	20% (假阳性)

[0086] 表1显示:本发明试剂盒与欧蒙医学诊断有限公司(以下简称欧蒙)抗核抗体谱的特异性良好,在健康人群以及其他疾病人群中(如黄疸病人、肾病病人,结果未显示)均未产生非特异性结果;而亚辉龙生物科技有限公司(以下简称亚辉龙)抗核抗体检测谱特异性稍差,在健康人群血样中存在近30%的假阳性检出率,且出现假阳性的诊断标记物多为红斑狼疮特异性标记物。

[0087] 进一步地:相较于欧蒙,本发明试剂盒对红斑狼疮、局限性硬皮病/系统性硬化症、皮炎/多肌炎等疾病的敏感性更强,表现出更高的检出率;而在混合型结缔组织病和干燥综合征两类疾病中,检出结果与欧蒙产品一致。

[0088] 另外,相较于亚辉龙,本发明试剂盒对干燥综合征、皮炎多肌炎等疾病的检出率

更好,混合型结缔组织病与局限性硬皮病/系统性硬化症等疾病中的检出率与其一致。虽然亚辉龙产品对红斑狼疮的检出率高达98%,但由于其红斑狼疮特异性指标在健康人群中存在30%的假阳性检出,因此该数据可信度不高,暂无法比较。

[0089] 综上,本发明试剂盒相较市场已有产品具有更好的特异性与灵敏度。

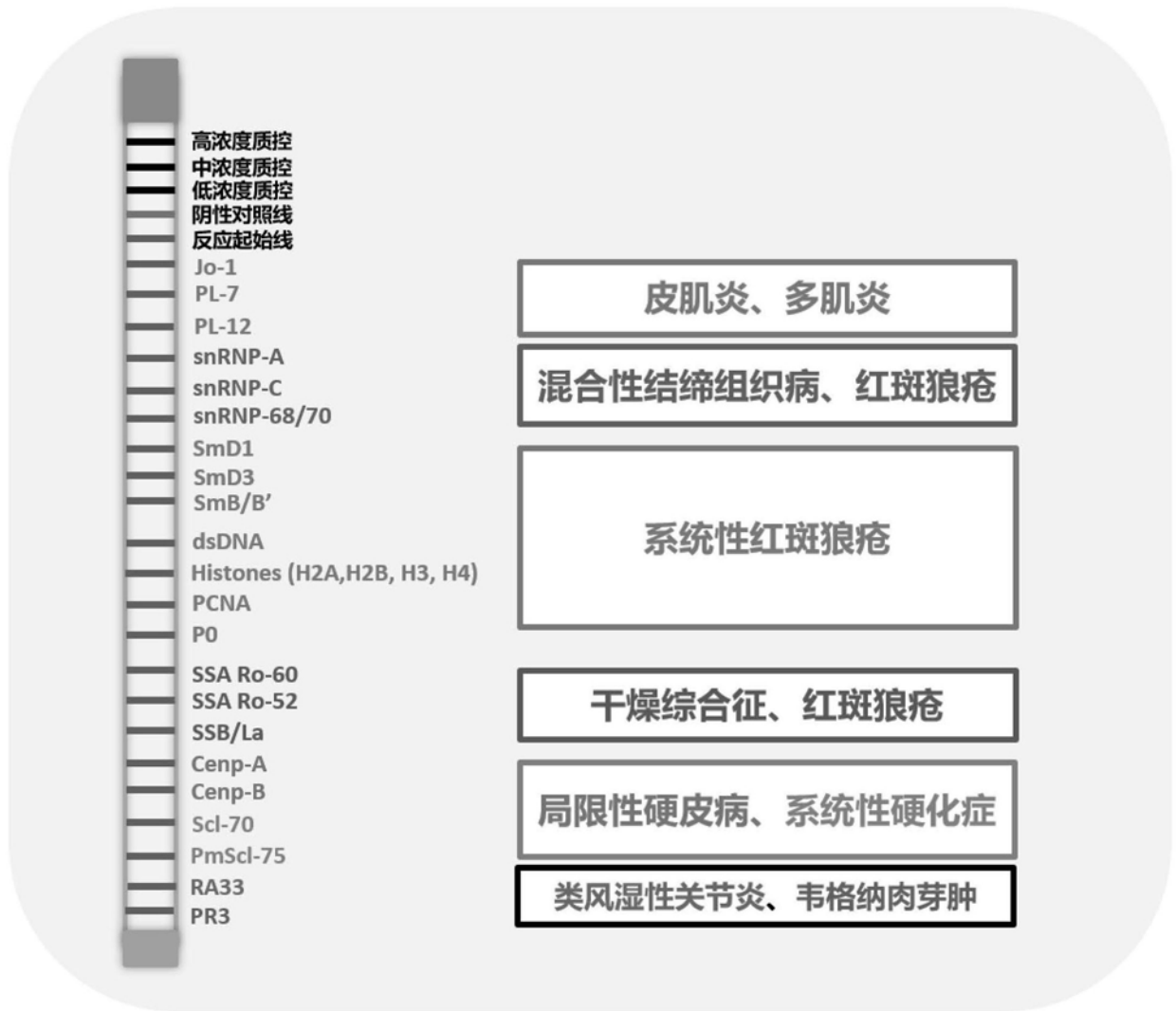


图1

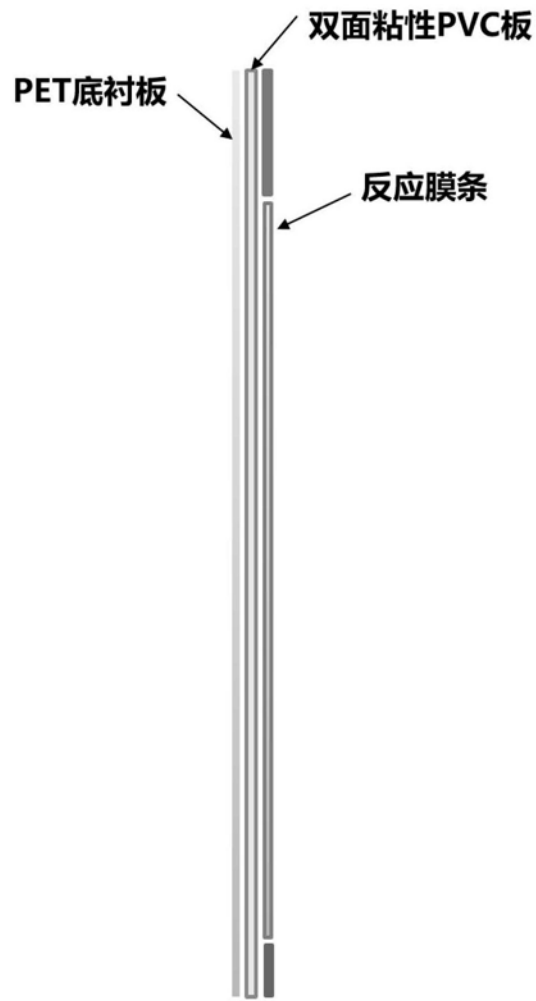


图2

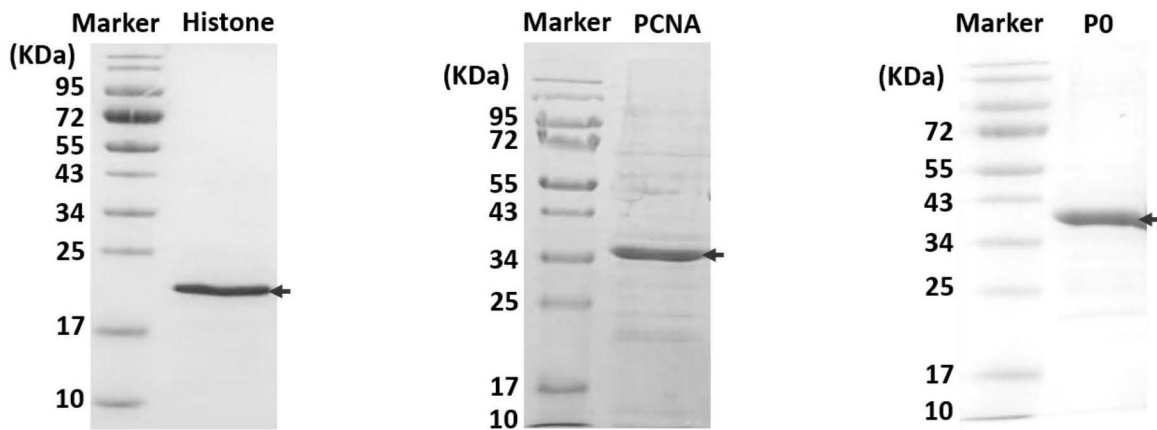


图3A

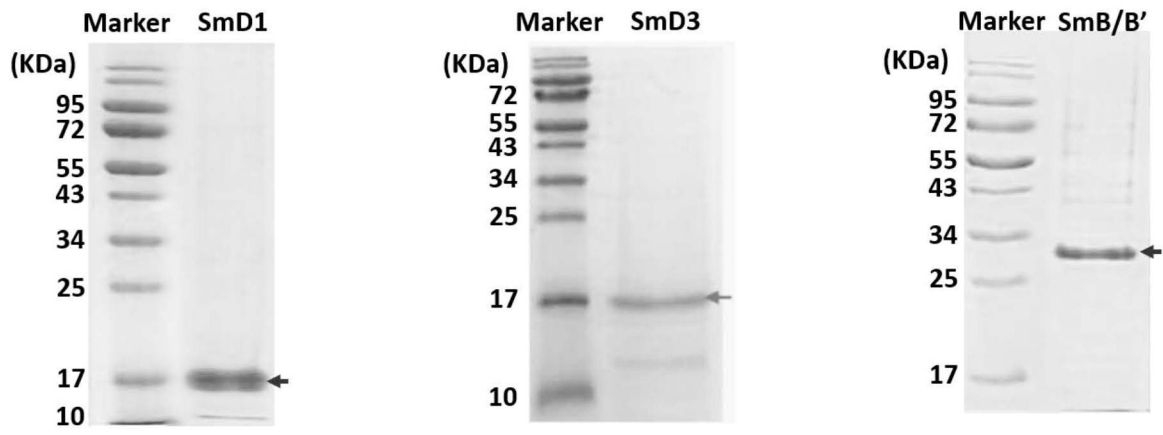


图3B

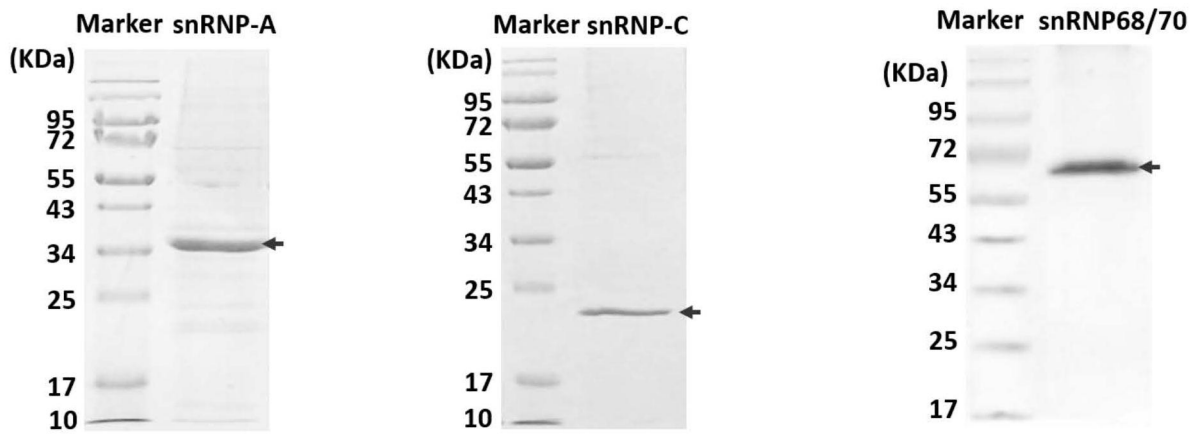


图3C

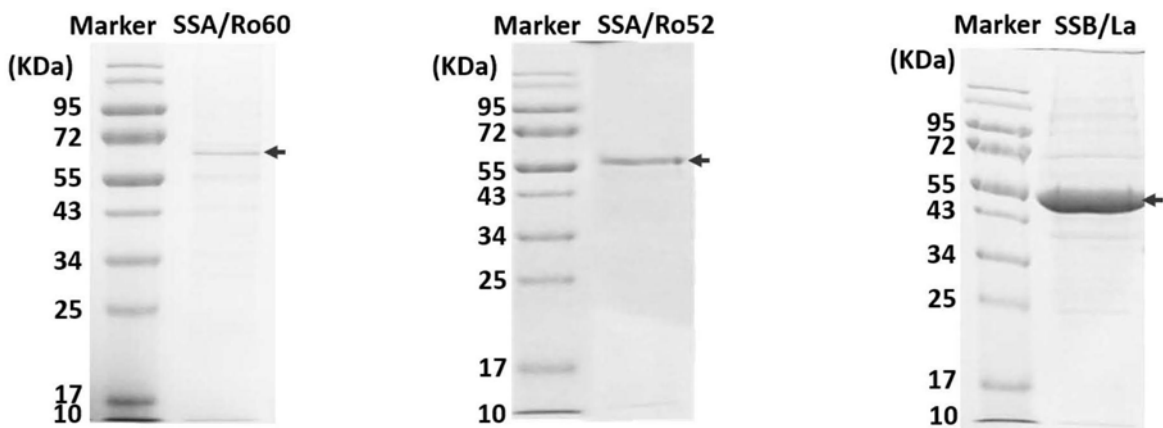


图3D

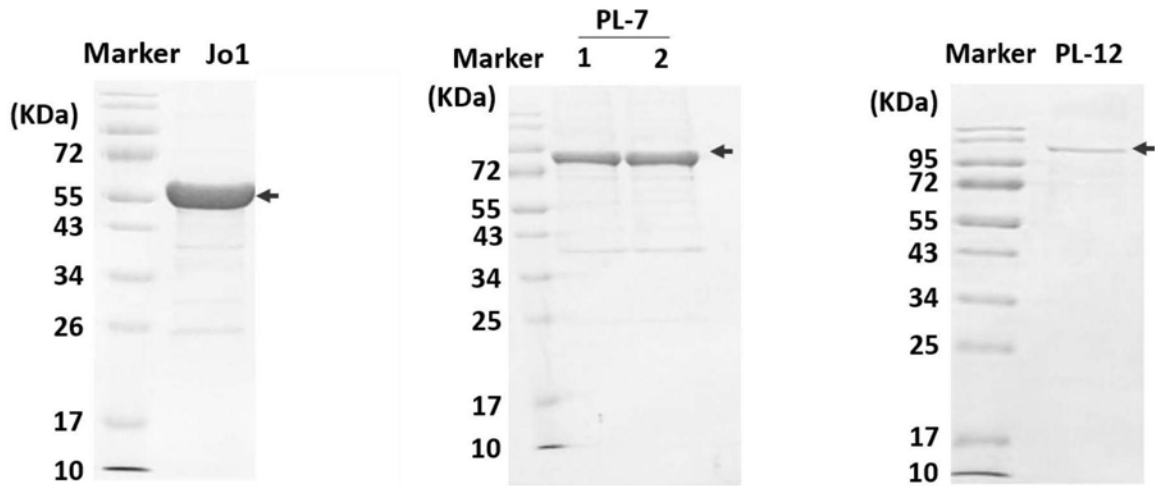


图3E

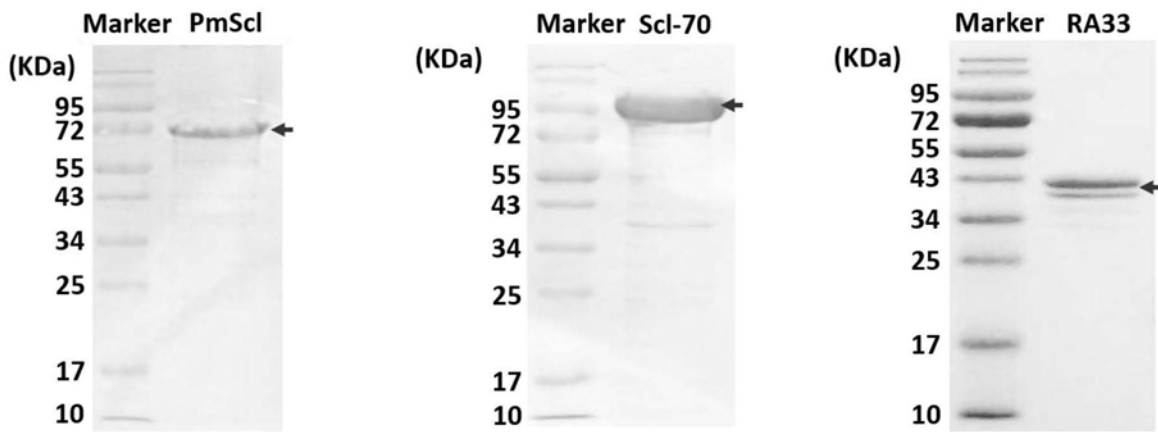


图3F

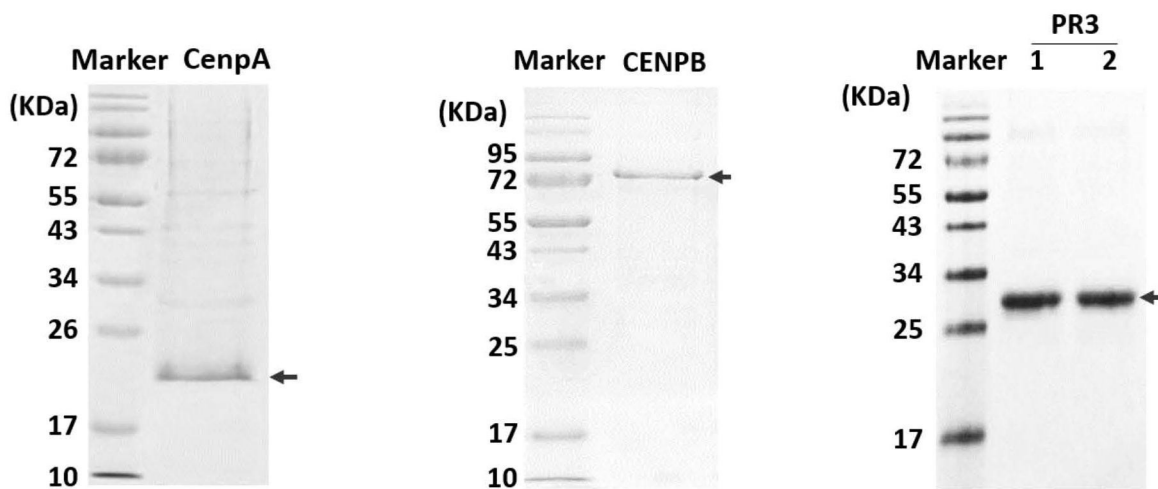


图3G

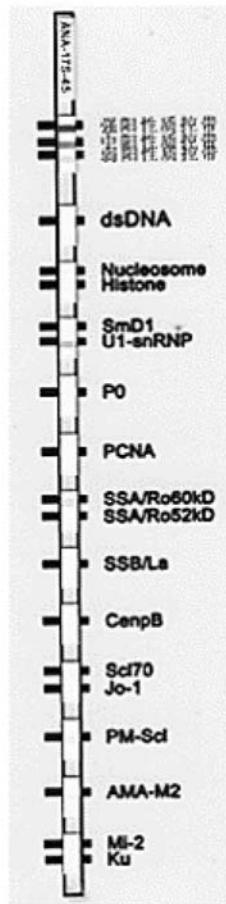


图4

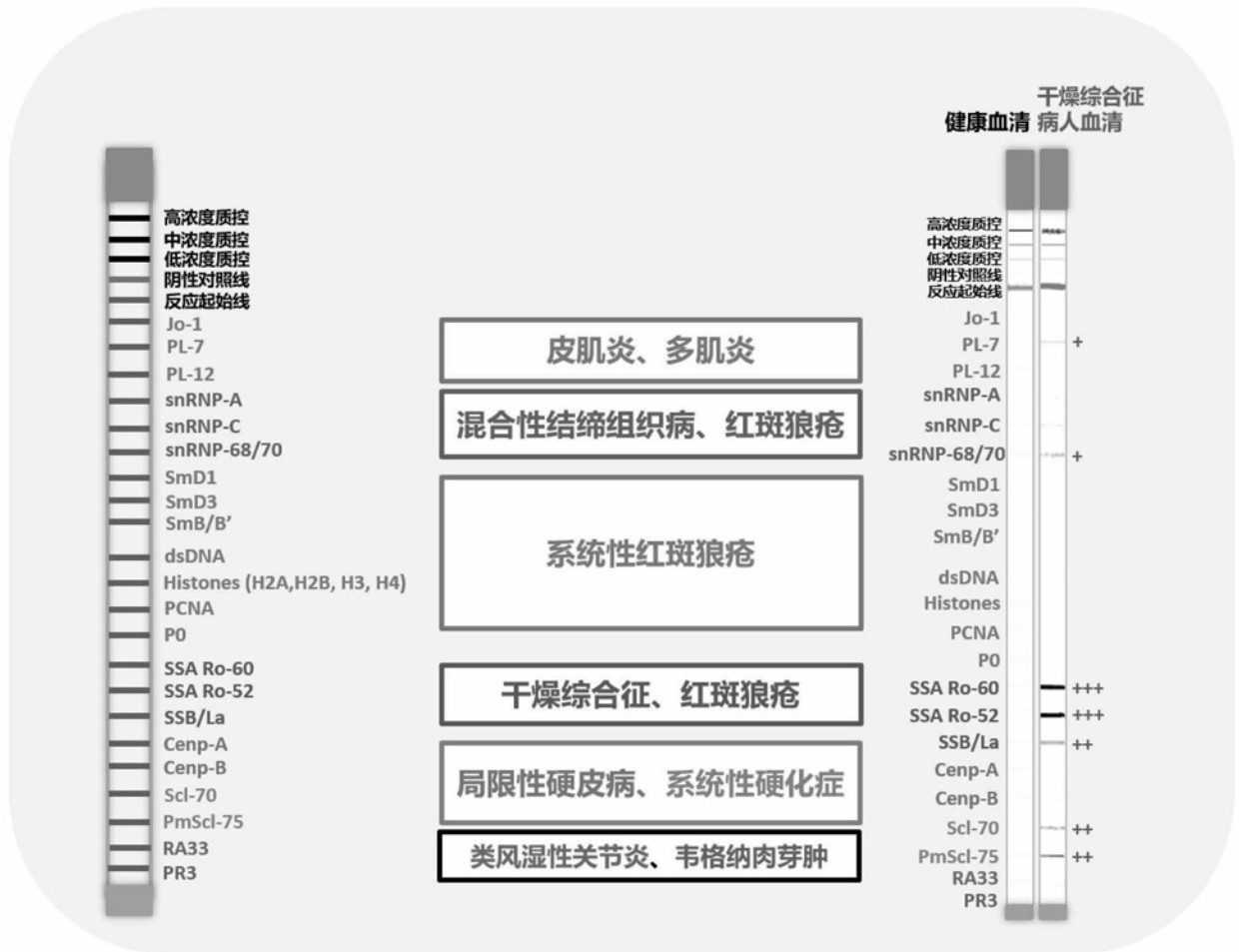


图5

专利名称(译)	一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途		
公开(公告)号	CN110346576A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201910244501.7	申请日	2019-03-28
[标]发明人	徐爱民 钟铃 韩灏 周鹏程		
发明人	徐爱民 钟铃 韩灏 凯·基恩 周鹏程 左陪军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6893 G01N2800/24		
代理人(译)	王卫彬		
优先权	201810279792.9 2018-04-01 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗原固定化基质膜及包含其的用于检测自身免疫疾病相关抗核抗体谱的试剂盒及其用途。所述的抗原固定化基质膜包含但不仅包含以下22条彼此独立的抗原检测线，所述的抗原检测线由双链DNA、组蛋白、核糖体P0蛋白、PCNA、SmD1、SmD3、SmB/B'、snRNP-A、snRNP-C、snRNP68/70、SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La、Jo-1、PL-7、PL-12、PmScl、Scl-70、CENP-A、CENP-B、RA33以及PR3组成。利用包含该抗原固定化基质膜的试剂盒进行检测，能够同时检测22种自身免疫抗体，用以辅助诊断8种常见弥漫性结缔组织病。

	红斑狼疮病人血样	混合型结缔组织病人血样	干燥综合征病人血样	局限性硬皮病/系统性硬化症病人血样	皮肌炎/多肌炎病人血样	健康人群血样
英诺诊断有限公司	82%	57%	50%	70%	50%	0%
欧蒙医学诊断有限公司	65%	57%	50%	60%	0%	0%
亚辉龙生物科技有限公司	98%	57%	38%	70%	0%	20% (假阳性)