

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/558 G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03114413.6

[43] 公开日 2003 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 1439877A

[22] 申请日 2003.1.9 [21] 申请号 03114413.6

[71] 申请人 中国人民解放军第四军医大学
地址 710032 陕西省西安市长乐西路 17 号

[72] 发明人 金伯泉 欧阳为明 薛江楠

[74] 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公
司

代理人 陈翠兰

权利要求书 2 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 的 ELISA 定量检测方法

[57] 摘要

可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 (sLAIR-1) 的定量检测方法, 涉及生物技术领域。其特征是, 用两株针对 LAIR-1 分子胞膜外区不同表位的单克隆抗体 (mAb FMU8 和 mAb 9.1C3), 建立双 mAb 夹心 ELISA 方法, 其中包被 mAb 为 9.1C3, 夹心 mAb 为 HRP 标记的 mAb FMU8, 即 HRP-FMU8。并设计提供优化的检测条件, 以定量检测标本中 sLAIR-1 水平。本发明首次在国内外提供了一种特异、灵敏、稳定的检测可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 (sLAIR-1) 的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 的定量检测方法，其特征在于：用两株针对 LAIR-1/9.1C3 分子胞膜外区不同表位的单克隆抗体（mAb）建立双 mAb 夹心 ELISA 方法，并设计提供优化的检测条件，以定量检测标本中的 sLAIR-1 的水平。

2. 根据权利要求 1 所述的可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 的定量检测方法，其特征在于：所述的两株用于夹心 ELISA mAb 是：包被 mAb 为 9.1C3，夹心 mAb 为 HRP-标记的 mAb FMU8，即 HRP-FMU8。

3. 根据权利要求 1 所述的可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 的定量检测方法，其特征在于：所述优化的检测条件是：

(1) 包被 mAb 的工作浓度为 5-10mg/L；

(2) 标准品为 LAIR-1/Fc 融合蛋白，标准品稀释液为 0.1% BSA-PBS，标准品最高工作浓度为 500 μ g/L，倍比稀释 10 个梯度作标准曲线；

(3) HRP-FMU8 的稀释液为 3% PEG-0.1% BSA -PBS，最佳工作浓度为 1.43mg/L（按 mAb FMU8 的量计算）。

4. 根据权利要求 1 所述的可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 的定量检测方法，其特征在于：所述简化的实施步骤为：

(1) 50m mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液包被 mAb 9.1C3, 加入 96 孔酶标板，100 μ l/孔，保湿，4 $^\circ\text{C}$ 放置 24h；

(2) 用洗涤液洗板 3 次，加入工作浓度标准品 LAIR-1/Fc 融合

蛋白或待测标本， 100 μ l/孔， 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;

(3) 洗板 3 次，加入工作浓度的 HRP-FMU8， 100 μ l/孔， 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;

(4) 洗板 9 次，以 ABTS 底物显色;

(5) ELISA 读数仪 405 nm 波长测定光吸收 (A) 值;

(6) 以标准品的 A 值和相应的浓度作标准曲线，求线性回归，计算待测标本的可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 水平。

可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 的 ELISA 定量检测方法

一、所属领域

本发明涉及生物技术领域，特别是有关可溶性免疫细胞膜分子的一种定量检测方法。

二、背景技术

许多免疫细胞膜分子都存在其可溶型形式，可在人体内发挥一定的生理和病理作用，目前已证明，部分可溶型膜分子可在相关疾病的诊断、发病机制和治疗中发挥重要作用。

白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 (LAIR-1, 又称 9.1C3) 分子是通过用人 NK 细胞免疫小鼠后获得的能阻断杀伤细胞功能的单克隆抗体 (包括 mAb 9.1C3) 而发现的。1997 年基因克隆成功并命名为白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 (Leukocyte associated immunoglobulin like receptor-1, LAIR-1), 胞浆区含有免疫受体酪氨酸抑制性基序 (ITIM)。LAIR-1 分布广泛, 表达于 NK 细胞、B 细胞、T 细胞、单核细胞、树突状细胞和胸腺细胞等。体外研究表明, LAIR-1 被其相应的单克隆抗体交联后, 传递强烈的抑制性信号, 可抑制包括 NK 细胞、B 细胞、T 细胞和树突状细胞前体等多种免疫细胞的功能。因此, 建立检测可溶型 LAIR-1(sLAIR-1)的酶联免疫吸附实验 (ELISA) 方法, 在基础研究和临床免疫学方面都有重要的应用价值。

通过资料检索, 国内外尚无任何有关检测可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 (sLAIR-1) 的夹心 ELISA 方法的报道。

三、发明内容

本发明的目的：提供一种特异、灵敏、稳定的 sLAIR-1 的定量检测方法。

本发明的技术方案是：用两株针对 LAIR-1/9.1C3 分子胞膜外区不同表位的单克隆抗体（monoclonal antibody, mAb），建立双 mAb 夹心 ELISA 方法，并设计提供优化的检测条件，以定量检测 sLAIR-1 的水平。

本发明的特点是：以 mAb 9.1C3 为包被抗体，以辣根过氧化物酶（HRP）标记的 mAb FMU8 为夹心抗体。

本发明的优点是：具有良好的特异性、敏感性和稳定性，操作时间较短，成本低。

四、具体实施方式

以下结合具体的实施例对本发明作进一步的描述。

1. 首先制备多株可识别 LAIR-1 分子胞膜外区不同表位的 mAbs，通过交叉配对选择出可用于夹心 ELISA 的最佳搭配：包被 mAb 为 9.1C3，夹心抗体为 HRP 标记的 mAb FMU8，即 HRP-FMU8。
2. 然后对本发明的工作条件进行优化：
 - （1）包被 mAb 的工作浓度为 5-10mg/L；
 - （2）标准品为 LAIR-1/Fc 融合蛋白，标准品稀释液为 0.1%BSA-PBS，标准品最高工作浓度为 500 μ g/L，倍比稀释 10 个梯度作标准曲线；
 - （3）HRP-FMU3 的稀释液为 3% PEG-0.1% BSA -PBS，最佳工

作浓度为 1.43mg/L (按 mAb FMU8 的量计算)。

2. 本发明的具体实施步骤: 用 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液包被 mAb 9.1C3, 加入 96 孔酶标板 (Nunc. 公司), 100 μl/孔, 保湿, 4 °C 放置 24h。用洗涤液 (0.1% Tween20-PBS, 下同) 洗板 3 次, 加入工作浓度标准品 LAIR-1/Fc 融合蛋白或待测标本, 100 μl/孔, 37 °C 孵育 60 min。洗板 3 次, 加入工作浓度的 HRP-FMU8, 100 μl/孔, 37 °C 孵育 60 min。洗板 9 次, 以 ABTS 底物显色, 100 μl/孔, 37 °C 放置约 5-30 min。ELISA 读数仪 405 nm 波长测定光吸收 (A) 值, 以标准品的 A 值和相应的浓度作标准曲线, 将待测标本的 A 值与标准曲线相比较, 求线性回归, 计算待测标本的 sLAIR-1 水平。结果显示, 采用优化的检测步骤后, 灵敏度高, 稳定性好, 检测范围在 1.5-500 μg/L 之间。

以下是发明人按本发明的技术方案所完成的实施例:

1. 肾综合征出血热患者 62 例, 正常人 24 例。结果, 正常人血清中 sLAIR-1 的平均水平为 6.2 ± 3.3 mg/L, 肾综合征出血热患者血清中 sLAIR-1 的平均水平为 47.2 ± 35.9 mg/L, 为正常人水平的 6.9 倍 ($P < 0.0001$)。
2. 小肠移植排斥患者 1 例, 肝脏移植排斥患者 1 例, 肾移植排斥患者 4 例, 血清中 sLAIR-1 的平均水平为 35.6 ± 41.0 mg/L, 为正常人的 5.6 倍 ($P < 0.05$)。

专利名称(译)	可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体1 的ELISA定量检测方法		
公开(公告)号	CN1439877A	公开(公告)日	2003-09-03
申请号	CN03114413.6	申请日	2003-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
[标]发明人	金伯泉 欧阳为明 薛江楠		
发明人	金伯泉 欧阳为明 薛江楠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	陈翠兰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体1(sLAIR - 1)的定量检测方法, 涉及生物技术领域。其特征是, 用两株针对LAIR - 1分子胞膜外区不同表位的单克隆抗体(mAb FMU8和mAb 9.1C3), 建立双mAb夹心ELISA方法, 其中包被mAb为9.1C3, 夹心mAb为HRP标记的mAb FMU8, 即HRP - FMU8。并设计提供优化的检测条件, 以定量检测标本中sLAIR - 1水平。本发明首次在国内外提供了一种特异、灵敏、稳定的检测可溶型白细胞相关免疫球蛋白样受体1(sLAIR - 1)的方法。