



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102937650 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201210455868. 1

(22) 申请日 2012. 11. 14

(73) 专利权人 四川新健康成生物股份有限公司
地址 610000 四川省成都市高新区天辰路
88 号

(72) 发明人 李想 周帅 何涛涛 陈洪 郑丽
陈卫 陈川

(74) 专利代理机构 成都行之专利代理事务所
(普通合伙) 51220

代理人 谭新民

(51) Int. Cl.

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/564 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

审查员 周露露

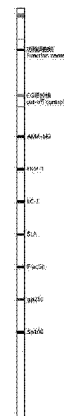
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒。该膜条的制备方法及其构成的试剂盒中，膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成，抗原条带由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成。本发明具有独创性的临界质控带，一个临界质控带可以同时两个乃至更多的检测条带(抗原条带)起到判读的作用，结果判定更加简单可靠。



1. 一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法,其特征在于,膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成,抗原条带由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成,所述临界质控带的制备方法包括下述步骤:

1)选择 m 个确诊为阴性的新鲜血液标本作为样本,膜条的抗原条带中具有 n 个抗原,取膜条对每一个样本进行检测,扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值,将 m 个样本中相同的抗原所检测抗体的灰度值作为一组数值得到 n 组数值,分别计算这 n 组数值的平均值 M_p 、标准差 SD_p 和各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p ,其中 $CO_p = (M_p + 2 \times SD_p)$, m 、 n 、 p 均为自然数且 $m \geq 120$, $n \geq 2$, $n \geq p \geq 1$;

2)将各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p 进行处理,计算其平均值 M 、标准差 SD 、变异系数 CV ;

3)如 $CV \leq 10\%$,则可得到膜条的临界质控值 CO ,其中 $CO = (M + 2 \times SD)$;如 $CV > 10\%$,调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2)重新测定,直至 $CV \leq 10\%$;

4)选择确诊为阳性的新鲜血液标本作为样本,取膜条对每一个样本进行检测,扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值,将其与膜条的临界质控值 CO 比较,如所有的样本灰度值均不小于 CO ,则 CO 有效;如有一个或以上的样本灰度值小于 CO ,需再次测定验证;如仍有一个或以上的样本灰度值小于 CO ,则调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2)、步骤 3)重新确定膜条的临界质控值 CO ;

5)根据确定的膜条的临界质控值确定临界质控带包被 IgG 的浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法,其特征在于,步骤 5)的具体步骤为:将一定浓度的人 IgG 溶于 Tris 或 Hepes 缓冲液中,然后划线于硝酸纤维素膜上制备成膜条,且膜条上仅包被临界质控带;随机选取 30 个膜条检测步骤 1)的随机阴性样本,并扫描灰度,计算 30 次测定的均值 M_s 、标准差 SD_s 和变异系数 CV_s ,其中 $CV_s = M_s / SD_s$;临界质控带合格的标准为:1) $0.97 \times CO \leq M_s \leq 1.03 \times CO$; 2) $CV_s < 5\%$;如果不符合其中的任意一个,则需重新调整浓度后重复本步骤所有实验,直至得到合格的临界质控带,此时的人 IgG 包被浓度即为临界质控带的包被浓度。

3. 一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,包括膜条、酶标液、底物和浓缩洗涤孵育液,膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成,抗原条带由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成;临界质控带同时为抗原条带中的至少两个抗原的对照条带;所述临界质控带的制备方法包括下述步骤:

1)选择 m 个确诊为阴性的新鲜血液标本作为样本,膜条的抗原条带中具有 n 个抗原,取膜条对每一个样本进行检测,扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值,将 m 个样本中相同的抗原所检测抗体的灰度值作为一组数值得到 n 组数值,分别计算这 n 组数值的平均值 M_p 、标准差 SD_p 和各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p ,其中 $CO_p = (M_p + 2 \times SD_p)$, m 、 n 、 p 均为自然数且 $m \geq 120$, $n \geq 2$, $n \geq p \geq 1$;

2)将各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p 进行处理,计算其平均值 M 、标准差 SD 、变异系数 CV ;

3)如 $CV \leq 10\%$,则可得到膜条的临界质控值 CO ,其中 $CO = (M + 2 \times SD)$;如 $CV > 10\%$,调

整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2) 重新测定,直至 $CV \leq 10\%$;

4) 选择确诊为阳性的新鲜血液标本作为样本,取膜条对每一个样本进行检测,扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值,将其与膜条的临界质控值 C_0 比较,如所有的样本灰度值均不小于 C_0 ,则 C_0 有效;如有一个或以上的样本灰度值小于 C_0 ,需再次测定验证;如仍有一个或以上的样本灰度值小于 C_0 ,则调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2)、步骤 3) 重新确定膜条的临界质控值 C_0 ;

5) 根据确定的膜条的临界质控值确定临界质控带包被人 IgG 的浓度。

4. 根据权利要求 3 所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述临界质控带的成分为 $20\text{ng} \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 的人 IgG。

5. 根据权利要求 4 所述的检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述临界质控带的成分为 $200\text{ng} \sim 2 \mu\text{g/mL}$ 的人 IgG。

6. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述底物为质量百分比浓度为 0.02%-2% 的鲁米诺或质量百分比浓度为 0.002%-0.2% 的过氧化氢构成的单一试剂。

7. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述抗原条带相互平行并且每个抗原条带宽度均一,各相邻抗原条带之间间隔等宽。

8. 根据权利要求 7 所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述抗原条带宽度为 0.5mm-3mm,相邻抗原条带之间间隔为 2mm-20mm。

9. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述自身免疫肝病疾病包括自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化。

10. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒,其特征在于,所述 Sp100、gp210、F-actin、LC-1 和 SLA 由昆虫细胞 sf9 表达并纯化制得;所述 AMA-M2 是从天然组织中提取制得;所述 LKM-1 是人工合成的多肽。

一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种诊断疾病的试剂盒,具体地,涉及一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒。

背景技术

[0002] 自身免疫性肝病是一类病因不明的慢性进行性肝脏疾病,与自身免疫反应密切相关,早期临床表现隐匿,难以与慢性病毒性肝炎区分,而这两种疾病的治疗方式有很大的不同。若治疗不当最终可发展为肝纤维化和肝硬化,只能通过肝移植延长患者生命。因此,自身免疫性肝病早期诊断和鉴别诊断是十分迫切和必要的。自身免疫性肝病都有特异性的抗体,是用于早期诊断和鉴别诊断疾病的重要依据。

[0003] 常见的自身免疫性肝病有自身免疫性肝炎(AIH),原发性胆汁性肝硬化(PBC)等。AIH的特征性的自身抗体有:抗LKM-1、LC-1、SLA和F-actin的抗体;PBC的特异性的自身抗体有抗AMA/M2、gp210、Sp100的抗体。

[0004] 对于自身免疫疾病诊断方法多采用间接免疫荧光分析法(IFA)、酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫印迹,但各有其不足。间接免疫荧光分析法是检测自身抗体的常用技术。其实实验基质一般是鼠肝片或猴肝片,含有完整的抗原谱,适合筛查试验。但是有如下缺点:不能作为确诊依据;结果的判断需要有丰富的经验;滴度的意义大于核型,但滴度的判定主观性强;灵敏度较低,特异性也不高。

[0005] 酶联免疫吸附法(ELISA)具有灵敏度高,可作为筛选实验,也可作为确诊依据,还可定量测定,检测病情和治疗效果。但一次试验只能检测单一指标,通量低,检测成本较高,在自身免疫疾病的诊断应用推广方面存在着极大的局限性。Western blot(WB)是在凝胶电泳和免疫分析技术基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有SDS-PAGE的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性的优点,比较适合发现未知的抗体。而对于检测已知的抗体,由于使用了天然的混合抗原,实验过程中经常出现找不到目标条带和条带偏移的问题,给结果的判读造成了不少困难,极易误判和漏判。同时WB使用时间长,也不适合在临床检验中推广。有人将WB改进,直接将纯化抗原包被于硝酸纤维素膜上,然后进行免疫反应检测抗体,形成了改良的免疫印迹方法,但目前还没有将该方法用于检测自身免疫肝病的3种自身抗体的应用。

[0006] 对于现有的试剂盒,存在下述缺点:

[0007] 1、WB使用时间长,操作复杂。

[0008] 2、WB使用了天然的混合抗原,实验过程中经常出现找不到目标条带和条带偏移的问题,给结果的判读造成了不少困难,极易误判和漏判。

[0009] 3、ELISA方法一次只能检测一个项目,效率不高。

[0010] 4、IFA方法仅能进行筛查,不具有辅助诊断的意义。

[0011] 5、目前还没有能同时检测自身免疫肝病相关的7种自身抗体的改良免疫印迹方

法。

[0012] 6、目前的试剂盒中，一般没有对照线或者一个对照线只能作为一个检测结果对照，没有能够同时至少作为 2 个检测结果对照的质控带。

发明内容

[0013] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒。采用该方法制备的膜条及具备该膜条的试剂盒，可以同时两个乃至更多的检测条带(检测结果)起到对照判读的作用。

[0014] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是：一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法，膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成，抗原条带由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成，所述临界质控带的制备方法包括下述步骤：1)选择 m 个确诊为阴性的新鲜血液标本作为样本，膜条的抗原条带中具有 n 个抗原，取膜条对每一个样本进行检测，扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值，将 m 个样本中相同的抗原所检测抗体的灰度值作为一组数值得到 n 组数值，分别计算这 n 组数值的平均值 M_p 、标准差 SD_p 和各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p ，其中 $CO_p = (M_p + 2 \times SD_p)$ ，m、n、p 均为自然数且 $m \geq 120$ ， $n \geq 2$ ， $n \geq p \geq 1$ ；2)将各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p 进行处理，计算其平均值 M、标准差 SD、变异系数 CV；3)如 $CV \leq 10\%$ ，则可得到膜条的临界质控值 CO，其中 $CO = (M + 2 \times SD)$ ；如 $CV > 10\%$ ，调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2)重新测定，直至 $CV \leq 10\%$ ；4)选择确诊为阳性的新鲜血液标本作为样本，取膜条对每一个样本进行检测，扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值，将其与膜条的临界质控值 CO 比较，如所有的样本灰度值均不小于 CO，则 CO 有效；如有一个或以上的样本灰度值小于 CO，需再次测定验证；如仍有一个或以上的样本灰度值小于 CO，则调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2)、步骤 3)重新确定膜条的临界质控值 CO；5)根据确定的膜条的临界质控值确定临界质控带包被 IgG 的浓度。

[0015] 该方法中，功能质控线属于现有技术，其目的是用于判断该膜条的一次反应是否有效。步骤 1) 的阴性和步骤 4) 的阳性是指当具有这些抗原所能检测的抗体时为阳性，不具有这些抗原所能检测的抗体为阴性。本方案的膜条的每个抗原都彼此独立地划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成一个独立的抗原检测线，这些所有的抗原检测线统称为抗原条带，步骤 1 中的“取膜条对每一个样本进行检测，扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值”，这里的灰度值为每一个抗原检测线检测样品后扫描得到的灰度值。步骤 5) 中根据确定的膜条的临界质控值，技术人员通过本领域的常规技术手段，可以得到合适的人 IgG 的浓度，采用现有的包被工艺，即可制备临界质控带，或者采用本发明下述的专用确定方式来确定。本方案的发明点可同时最多检测自身免疫肝病相关的 7 种自身抗体，而且设置了一个可以同时两个乃至更多的检测条带(抗原条带)起到判读的临界质控带。随着检测条带的增多，每增加一条被检测条带，都要对重新进行完整的临界质控值确定实验，同时实验难度显著加大。通常，确定一个临界质控值需要许多次实验，才能最终确定。

[0016] 具体地，步骤 5) 的具体步骤为：将一定浓度的人 IgG 溶于 Tris 或 Hepes 缓冲液中，然后划线于硝酸纤维素膜上制备成膜条，且膜条上仅包被临界质控带；随机选取 30 个膜条

检测步骤 1) 的随机阴性样本, 并扫描灰度, 计算 30 次测定的均值 M_s 、标准差 SD_s 和变异系数 CV_s , 其中 $CV_s = M_s / SD_s$; 临界质控带合格的标准为: 1) $0.97 \times CO \leq M_s \leq 1.03 \times CO$; 2) $CV_s < 5\%$; 如果不符合其中的任意一个, 则需重新调整浓度后重复本步骤所有实验, 直至得到合格的临界质控带, 此时的人 IgG 包被浓度即为临界质控带的包被浓度。

[0017] 一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒, 包括膜条、酶标液、底物和浓缩洗涤孵育液, 膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成, 抗原条带由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成; 临界质控带同时为抗原条带中的至少两个抗原的对照条带。

[0018] 所述临界质控带的成分为 $20\text{ng} \sim 20\ \mu\text{g/mL}$ 的人 IgG。现有技术中有选用抗羊 IgG 作为对照线的记载, 如 CN200810132304.8 中, 但是该专利中的每一个抗原条带上都需要划一个抗羊 IgG 的对照线, 这样制作工艺比较比较繁琐, 而且成本较高, 在 CN200810132304.8 中, 没有关于同一对照线可以用于 2 个或者 2 个以上的抗原条带判读的记载。本发明通过创造性实验发现, 选择一定浓度范围的人 IgG 作为临界质控带, 可以清楚、准确的对 2 个或者 2 个以上的抗原条带进行判读。

[0019] 作为进一步的优选, 所述临界质控带的成分为 $200\text{ng} \sim 2\ \mu\text{g/mL}$ 的人 IgG。

[0020] 所述底物为质量百分比浓度为 0.02%-2% 的鲁米诺或质量百分比浓度为 0.002%-0.2% 的过氧化氢构成的单一试剂。

[0021] 所述抗原条带相互平行并且每个抗原条带宽度均一, 各相邻抗原条带之间间隔等宽。

[0022] 所述抗原条带宽度为 0.5mm-3mm, 相邻抗原条带之间间隔为 2mm-20mm。

[0023] 所述自身免疫肝病疾病包括自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化。

[0024] 所述 Sp100、gp210、F-actin、LC-1 和 SLA 由昆虫细胞 sf9 表达并纯化制得; 所述 AMA-M2 是从天然组织中提取制得; 所述 LKM-1 是人工合成的多肽

[0025] 与现有技术相比较, 本发明的有益效果是:

[0026] 1、可同时检测自身免疫肝病相关的 7 种自身抗体, 并可作为辅助诊断的依据。

[0027] 2、本发明具有独创性的临界质控带, 一个临界质控带可以同时两个乃至更多的检测条带(抗原条带)起到判读的作用, 将显色条带与临界质控带的颜色的深浅比较即可判断结果: 阳性: 颜色比临界质控带相同或深; 阴性: 颜色比临界质控带浅。

[0028] 3、本发明还改良了单试剂底物, 加入底物后不需终止。

[0029] 4、每个抗原条带宽度均一, 条带间隔等宽, 膜条背景干净, 使结果判定更加简单可靠。

附图说明

[0030] 图 1 是本发明膜条的结构示意图;

[0031] 图 2 是临界质控值确定流程图。

具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步的详细描述, 但本发明的实施方式不仅

限于下述实施例。

[0033] 实施例 1：

[0034] 参见图 1 至图 2 所示，图 2 中的 CO 质控线即为临界质控带；本实施例的检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒包括膜条、酶标液、底物和浓缩洗涤孵育液，其中酶标液、底物和浓缩洗涤孵育液的选择都属于现有技术，对于酶标液、底物和浓缩洗涤孵育液而言，选用现有技术的产品也可以实现本发明的技术方案。

[0035] 膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成，抗原条带由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成，本实施例的临界质控带的成分为 $20\text{ng}\sim 20\mu\text{g/mL}$ 的人 IgG。

[0036] 本试剂盒创造性的加入了能同时最多对 7 个被检抗体(抗原条带)进行阴阳性判定的临界质控带。具体的流程见图 2 的流程图所示。临界质控带的临界质控值确定方法包括下述步骤：

[0037] 1) 选择 m 个确认为阴性的新鲜血液标本作为样本，膜条的抗原条带中具有 n 个抗原，取膜条对每一个样本进行检测，扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值，将 m 个样本中相同的抗原所检测抗体的灰度值作为一组数值得到 n 组数值，分别计算这 n 组数值的平均值 M_p 、标准差 SD_p 和各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p ，其中 $CO_p=(M_p+2\times SD_p)$ ， m 、 n 、 p 均为自然数且 $m\geq 120$ ， $n\geq 2$ ， $n\geq p\geq 1$ ；

[0038] 2) 将各个抗原所检测抗体的临界质控值 CO_p 进行处理，计算其平均值 M 、标准差 SD 、变异系数 CV ；

[0039] 3) 如 $CV\leq 10\%$ ，则可得到膜条的临界质控值 CO ，其中 $CO=(M+2\times SD)$ ；如 $CV>10\%$ ，调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2) 重新测定，直至 $CV\leq 10\%$ ；

[0040] 4) 选择确认为阳性的新鲜血液标本作为样本，取膜条对每一个样本进行检测，扫描得到膜条中每一个抗原所检测抗体的灰度值，将其与膜条的临界质控值 CO 比较，如所有的样本灰度值均不小于 CO ，则 CO 有效；如有一个或以上的样本灰度值小于 CO ，需再次测定验证；如仍有一个或以上的样本灰度值小于 CO ，则调整印迹抗原量重复步骤 1)、步骤 2)、步骤 3) 重新确定膜条的临界质控值 CO ；

[0041] 5) 根据确定的膜条的临界质控值确定临界质控带包被人 IgG 的浓度。

[0042] 总的来说，临界质控值的确定有两个关键点，第一是 7 个条带的灰度上限的 CV 不能超过 10%，否则需要重新调整相应抗原的印迹浓度后再进行实验。第二是用阳性样本来验证临界质控带，如果两次实验某个样本的灰度都小于临界质控值，那么需要重新做整个实验。并且随着检测条带的增多，每增加一条被检测条带，都要对重新进行完整的临界质控值确定实验，同时实验难度显著加大。通常，确定一个临界质控值需要许多次实验，才能最终确定。

[0043] 实施例 2：

[0044] 本实施例是对由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 这 7 个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成的抗原条带进行试验测定。在实施例 1 的基础上，为了使结果判定更加简单可靠，将每个抗原条带宽度均一设置，条带间隔等宽，抗原条带宽度为 0.5mm-3mm，相邻抗原条带之间间隔为 2mm-20mm，膜条背景干净，并且采用改良的单试剂底物，加入底物后不需终止，底物为鲁米诺 0.02%-2% 或过氧化氢 0.002%-0.2% 构成

的单一试剂；所有的印迹抗原都是高度纯化的，且采用了国际最新的包被工艺，具体包被方法见后述。

[0045] 临界质控值的确定：

[0046] 1) 确定各抗体的临界质控值

[0047] 随机选取临床确诊为阴性的新鲜血清、血浆标本 122 份，用本实施例的试剂盒检测。测定其抗原条带所检测的相应抗体的灰度值，计算 122 份标本中各相同抗体的灰度值均值 M_p 和标准差 SD_p ，可得到每个抗体 95% 的置信上限 ($M_p+2 \times SD_p$)，即为各抗体的临界质控值，记作 CO_p 。结果见下表，本实施例 $m=122$ ， $n=p=3$ 。

[0048]

	M_p	SD_p	CO_p
AMA-M2	103.5	18.2	139.9
LKM-1	92.3	15.7	123.7
LC-1	94.6	16.4	127.4
SLA	108.6	16.8	142.2
F-actin	95.7	17.8	131.3
gp210	96.4	16.4	129.2
Sp100	87.6	17.5	122.6

[0049] 2) 确定膜条的临界质控值

[0050] 将上述各抗体的 CO_p 进行处理：计算它们的平均值 M 和标准差 SD 和变异系数 CV ($CV = M/SD$)，若 $CV > 10\%$ ，应调整相应印迹抗原的浓度，重做步骤 1)、步骤 2)；若 $CV \leq 10\%$ ，则可得到膜条的临界质控值，记作 $CO = (M+2 \times SD)$ 。结果见下表：

[0051]

AMA-M2	139.9
LKM-1	123.7
LC-1	127.4
SLA	142.2
F-actin	131.3
gp210	129.2
Sp100	122.6
M	130.9
SD	7.6
CV	5.8%
CO	146.1

[0052] 本次实验 $CV = 5.8\%$ ， CO 有效，为 146.1。

[0053] 3) 验证膜条的临界质控值的有效性。

[0054] 随机选取临床确诊为阳性的新鲜血清、血浆标本 213 份，测定其相应抗体灰度值，与 CO 比较。经试验确定，本次实验所有阳性样本的灰度值均超过临界质控值，该临界质控值有效。

[0055] 实施例 3：

[0056] 本实施例是根据实施例 2 确定的膜条的临界质控值(在图 2 及本发明的所有实施例中， CO_p 为单个抗体的临界质控值， CO 为整个膜条的临界质控值)，来调节临界质控带包被

人 IgG 的浓度,最终确定临界质控带的包被浓度和包被工艺。具体操作为:将一定浓度的人 IgG 溶于 Tris 或 Hepes 缓冲液中,然后用全自动点样仪划线于硝酸纤维素膜上,并经过封闭、干燥、切割等工艺制备成成品膜条,且膜条上仅包被临界质控带。随机选取 30 个膜条用本试剂盒检测随机阴性样本,并扫描灰度,计算 30 次测定的均值(M_s)、标准差(SD_s)和变异系数(CV_s),其中 $CV_s = M_s / SD_s$ 。临界质控带合格的标准为:1) $0.97 \times CO \leq M_s \leq 1.03 \times CO$; 2) $CV_s < 5\%$ 。如果不符合其中的任意一个,则需重新调整浓度或包被工艺进行本实施例所述的所有实验,直至得到合格的临界质控带,此时的人 IgG 包被浓度即为临界质控带的包被浓度。结果见下表:

[0057]

30 次测定的灰度值	144.0	141.3	147.1
	149.6	148.8	149.4
	150.4	145.6	142.8
	142.2	138.5	140.1
	147.3	145.5	146.4
	149.5	145.9	148.9
	142.8	140.1	141.9
	149.1	150.5	147.7
	141.2	147.5	148.7
	146.2	145.0	146.3
M_s	145.7		
SD_s	3.4		
CV_s	2.4%		

[0058] 其中, $M_s = 145.7 = 0.99 \times CO$; $CV_s = 2.4\% < 5\%$, 均符合要求。此时的临界质控带的包被浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 。

[0059] 实施例 4:

[0060] 采用实施例 1 的技术方案,我们对由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的随机选取 3 个彼此独立地划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成抗原条带,再进行试验测定,其结果如下:

[0061] 1) 确定各抗体的临界质控值

[0062] 根据实施例 1 步骤 1) 的方法,随机选取临床确诊为阳性的新鲜血清、血浆标本 123 份用本试剂盒测定,各抗体的临界质控值 CO_p 的结果见下表。本实施例中, $m=123$, $n=p=3$ 。

[0063]

	M_p	SD_p	CO_p
LKM-1	95.6	16.2	128.0
SLA	88.4	17.4	123.2
F-actin	98.7	18.6	135.9

[0064] 2) 确定膜条的临界质控值

[0065] 根据实施例 1 步骤 2) 的方法,得到 M 、 CO 和 CV , 结果见下表。

[0066]

LKM-1	128
SLA	123.2
F-actin	135.9
M	129.0
SD	6.4
CV	5.0%
CO	141.9

[0067] 本次实验 $CV = 5.0\%$, CO 有效, 为 141.9。

[0068] 3) 验证膜条的临界质控值的有效性。

[0069] 根据实施例 1 步骤 3) 的方法, 随机选取临床确诊为阳性的新鲜血清、血浆标本 92 份进行检测。结果: 所有阳性样本的灰度值均超过临界质控值, 该临界质控值有效。

[0070] 4) 临界质控带包被浓度的确定。

[0071] 根据实施例 2 的方法, 计算 30 个膜条测定的均值 (M_s)、标准差 (SD_s) 和变异系数 (CV_s)。结果见下表:

[0072]

30 次测定的灰度值	146.5	140.8	143.9
	135.7	131.3	128.6
	143.5	143.2	146.9
	134.4	133.1	136.9
	144.1	148.0	146.5
	136.5	140.3	147.0
	135.0	136.5	132.4
	135.8	142.5	141.8
	146.9	147.5	143.2
	133.6	137.5	136.6
M_s	139.9		
SD_s	5.6		
CV_s	4.0%		

[0073] 其中, $M_s = 139.9 = 0.98 \times CO$; $CV_s = 4.0\% < 5\%$, 均符合要求。此时的临界质控带的包被浓度为 500ng/mL。

[0074] 实施例 5:

[0075] 采用实施例 1 的技术方案, 我们对由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中的随机选取 2 个彼此独立地划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成抗原条带, 再进行试验测定, 其结果如下:

[0076] 1) 确定各抗体的临界质控值

[0077] 根据实施例 1 步骤 1) 的方法, 随机选取临床确诊为阳性的新鲜血清、血浆标本 122 份用本试剂盒测定, 各抗体的临界质控值 CO_p 的结果见下表。本实施例中, $m=122$, $n=p=2$ 。

[0078]

	M_p	SD_p	CO_p
AMA-M2	78.6	13.7	106.0
gp210	85.2	15.4	116.0

[0079] 2) 确定膜条的临界质控值

[0080] 根据实施例 1 步骤 2) 的方法, 得到 M、CO 和 CV, 结果见下表。

[0081]

AMA-M2	106.0
gp210	116.0
M	111.0
SD	7.1
CV	6.4%
CO	125.1

[0082] 本次实验 $CV = 6.4\%$, CO 有效, 为 125.1。

[0083] 3) 验证膜条的临界质控值的有效性。

[0084] 根据实施例 1 步骤 3) 的方法, 随机选取临床确诊为阳性的新鲜血清、血浆标本 92 份进行检测。结果: 所有阳性样本的灰度值均超过临界质控值, 该临界质控值有效。

[0085] 4) 临界质控带包被浓度的确定。

[0086] 根据实施例 2 的方法, 计算 30 个膜条测定的均值 (M_s)、标准差 (SD_s) 和变异系数 (CV_s)。结果见下表:

[0087]

30 次测定的灰度值	126.5	132.8	132.1
	123.2	124.4	125.0
	134.2	135.6	131.2
	128.5	122.8	126.8
	133.4	127.6	121.8
	123.2	128.3	123.9
	131.6	127.6	122.8
	122.7	119.6	113.7
	125.2	128.9	125.7
	132.3	126.4	120.2
M_s	126.6		
SD_s	4.9		
CV_s	3.9%		

[0088] 其中, $M_s = 126.6 = 1.01 \times CO$; $CV_s = 3.9\% < 5\%$, 均符合要求。此时的临界质控带的包被浓度为 20ng/mL。

[0089] 由 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 中随机选择 4 个抗原, 按照实施例 2、实施例 3 的方法实验 10 次, 得到临界质控带的包被浓度分别为 145ng/ml、200ng/ml、350 ng/ml、621 ng/ml、735 ng/ml、930 ng/ml、1.1 μ g/ml、2 μ g/ml、8 μ g/ml、16 μ g/ml。在上述的全部实施例中, 实验结果表明, 人 IgG 浓度在 20ng~200ng/mL、2 μ g

~20 μ g/mL 的范围内时,其包被的临界质控带都可以同时用于至少 2 个抗原条带的比对,但是确定临界质控带的包被浓度需要做实验的次数较多;在 200ng~2 μ g/mL 的范围内,实验表明这个浓度范围内确定临界质控带时,所需要的实验次数显著减少,可以较快的确定临界质控带的包被浓度,减少了实验成本并提高了产品的生产效率。

[0090] 在上述的全部实施例中,酶标液、底物和浓缩洗涤孵育液都可以使用现有技术已经公开的方案,酶标液可以优选辣根过氧化物酶标记的羊/鼠/兔抗人 IgG 抗体。上述自身免疫肝病疾病包括自身免疫性肝炎,原发性胆汁性肝硬化等。所述 AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 由昆虫细胞 sf9 表达并纯化制得。本发明具有独创性的临界质控带,将显色条带与临界质控带的颜色的深浅比较即可判断结果:阳性:颜色比临界质控带相同或深;阴性:颜色比临界质控带浅。检测的抗体数共 7 种:AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210 和 Sp100 相应的自身抗体。本发明所使用的抗原绝大多数为重组抗原,且所有的抗原纯度均为 98% 以上,显著地提高了检测的灵敏度和特异性。

[0091] 上述实施例中应用到的技术包括:

[0092] 1) 抗原鉴定:通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定抗原及其纯度应 >98%。

[0093] 2) 包被:将人 IgG 和本实施例的 7 种抗原分别溶解于 0.01-0.1M 的 tris 缓冲液或 HEPES 缓冲液, pH7.4, 得到浓度为 1-100mg/mL 溶液。将 1-100 μ l 的上述溶液用全自动点样仪划线于硝酸纤维素膜上,条带宽度为 0.5mm-3mm,条带间隔为 2mm-20mm。4 $^{\circ}$ C 包被 24-48 个小时。各种抗原的排列顺序可以进行任意调整。

[0094] 3) 封闭:用 10-100ml 的含 0.05-0.5%Tween20, 0.5-5%BSA, 0.5-5%酪蛋白, 0.5-5%的脱脂奶粉, 5-10%的蔗糖的 0.01-0.1M 的 tris 缓冲液或 HEPES 缓冲液, pH7.4, 25-37 $^{\circ}$ C 封闭 3-12 小时,用孵育洗涤缓冲液洗涤。晾干后,于 2-8 $^{\circ}$ C 备用。

[0095] 4) 膜条制备:将所制备的硝酸纤维膜固定在载片上,牢固后,用全自动切割机将其切割成为 1mm-3mm 宽的膜条,分装到膜条盒中。

[0096] 4) 酶标液:经典的高碘酸钠氧化法标记辣根过氧化物酶(HRP)到羊/鼠/兔抗人 IgG 抗体,组分:标记 HRP 的羊/鼠/兔抗人 IgG 抗体 0.01-0.1%, 0.2-2%BSA, 0.2-2%蔗糖, Proclin 300 0.01-0.1%, 吐温-20 0.01-0.1%, PBS0.01-0.1mol/L。

[0097] 5) 孵育洗涤缓冲液:PBS0.01-0.1mol/L, 0.2-2%BSA, Proclin 300 0.01-0.1%, 吐温-20 0.01-0.1%。孵育洗涤缓冲液有洗涤和孵育两大功能,可用于稀释样本,孵育样本和洗涤膜条。

[0098] 6) 底物配制:鲁米诺或其衍生物 0.02%-2%, 过氧化氢 0.002%-0.2%, Proclin 300 0.01-0.1%, 吐温-20 0.01-0.1%。底物无需终止,膜条显色后用蒸馏水洗涤 3 次晾干即可,显色长期稳定。

[0099] 7) 试剂盒的组装:将膜条盒、孵育洗涤缓冲液、酶标液、底物包装成试剂盒。

[0100] 如上所述,可较好的实施本发明。

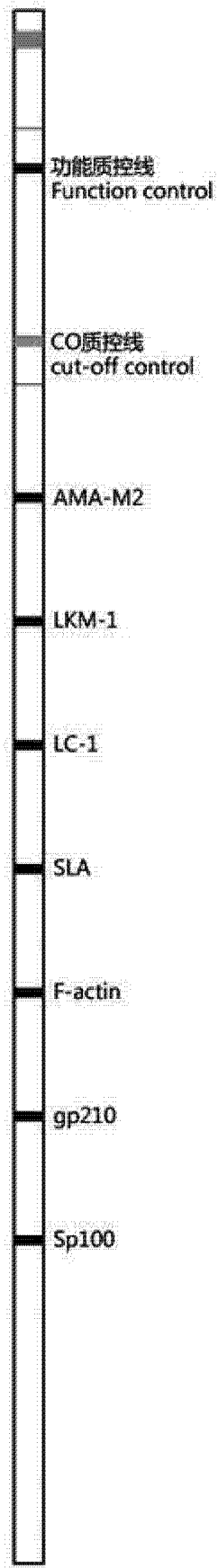


图 1

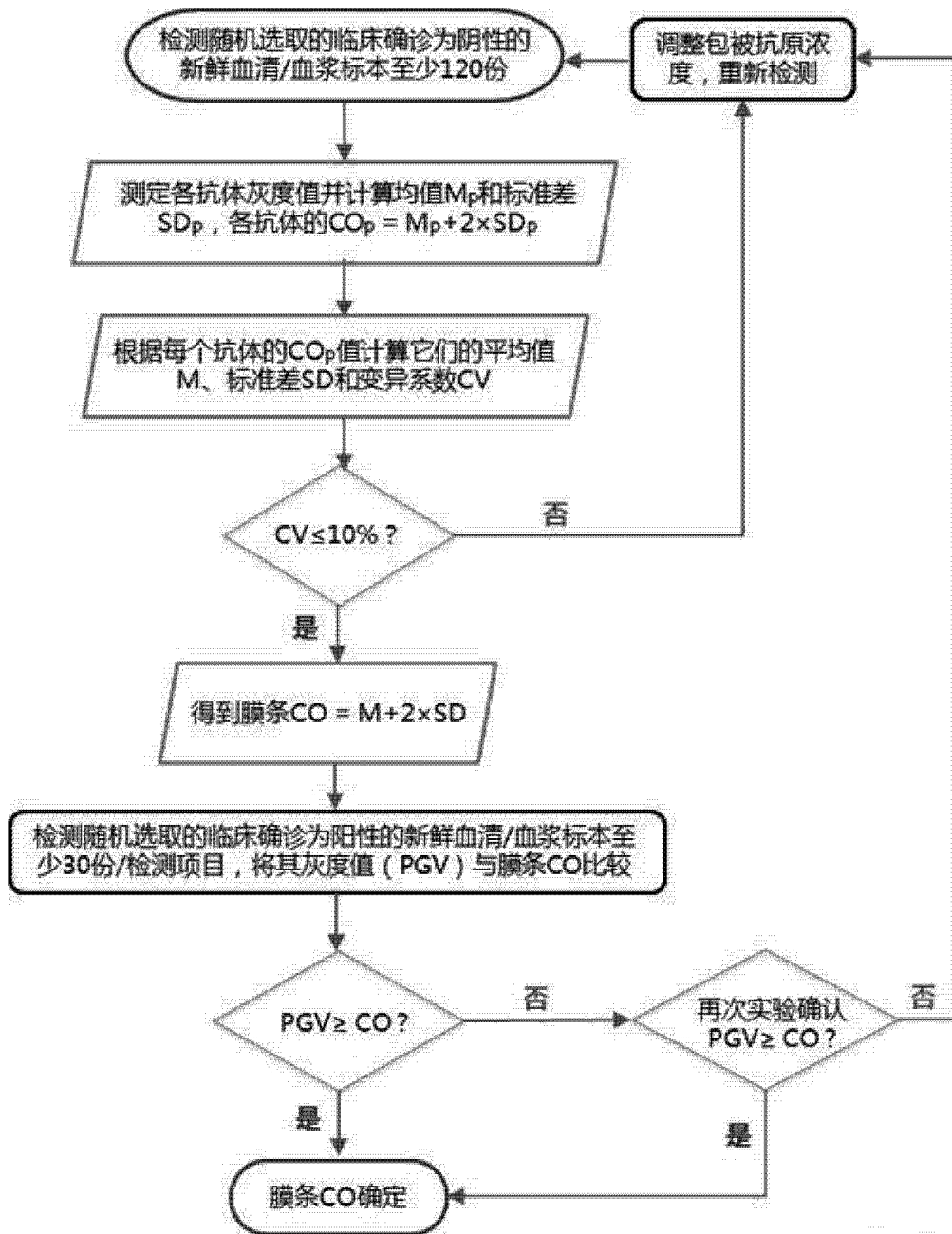


图 2

专利名称(译)	一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒		
公开(公告)号	CN102937650B	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201210455868.1	申请日	2012-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	四川省新成生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	四川省新成生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	四川新健康成生物股份有限公司		
[标]发明人	李想 周帅 何涛涛 陈洪 郑丽 陈卫 陈川		
发明人	李想 周帅 何涛涛 陈洪 郑丽 陈卫 陈川		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/564 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	谭新民		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN102937650A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测自身免疫肝病相关自身抗体谱的试剂盒的膜条的制备方法及其构成的试剂盒。该膜条的制备方法及其试剂盒中，膜条由载片和依次固定在载片上的抗原条带、临界质控带、功能质控线构成，抗原条带由AMA-M2、LKM-1、LC-1、SLA、F-actin、gp210和Sp100中的至少两个彼此独立的划线到硝酸纤维素膜或尼龙膜上形成。本发明具有独创性的临界质控带，一个临界质控带可以同时两个乃至更多的检测条带（抗原条带）起到判读的作用，结果判定更加简单可靠。

