



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102279273 A

(43) 申请公布日 2011.12.14

(21) 申请号 201110202323.5

G01N 33/96(2006.01)

(22) 申请日 2011.07.19

(83) 生物保藏信息

CCTCC C201131 2011.05.24

(71) 申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路 199 号

(72) 发明人 赵益明 阮长耿 季顺东 杨剑锋

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务有限公司 32103

代理人 陶海锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

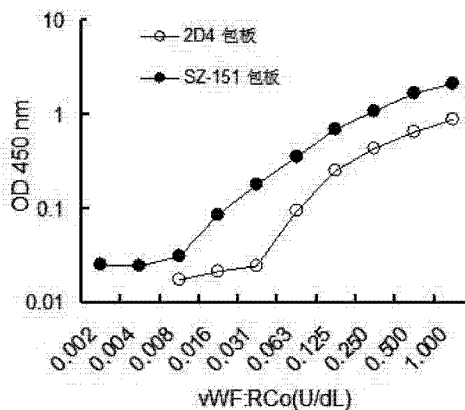
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒,包括:固相化包被抗体的酶标板,辣根过氧化物酶标记的检测抗体,标准品,瑞斯托霉素,重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白,样品稀释缓冲液,显色液,终止液,其中,所述包被抗体为抗血小板膜糖蛋白 Ib α 的单克隆抗体 SZ-151;所述检测抗体为兔抗人 VWF 多抗;所述标准品为混合标准血浆。采用该试剂盒检测检测 vWF:RCof 时具有良好的重复性、灵敏度,且测试结果和 vWF:Ag、vWF:CBA 具有良好的相关性。



1. 一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒,包括:固相化包被抗体的酶标板,辣根过氧化物酶标记的检测抗体,标准品,瑞斯托霉素,重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白,样品稀释缓冲液,显色液,终止液,其特征在于,所述包被抗体为抗血小板膜糖蛋白 Ib α 的单克隆抗体 SZ-151;所述检测抗体为兔抗人 VWF 多抗;所述标准品为混合标准血浆;

所述单克隆抗体 SZ-151 由杂交瘤细胞 SZ-151 制备得到,所述杂交瘤细胞 SZ-151 的保藏信息为:保藏日期:2011 年 5 月 24 日;保藏单位:中国典型培养物保藏中心;保藏地址:中国武汉武汉大学;保藏编号:CCTCC C201131;分类命名:杂交瘤细胞 SZ-151。

2. 根据权利要求 1 所述血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒,其特征在于,正常混合标准血浆的制备方法为:(1) 取外周静脉血,采用枸橼酸三钠抗凝,离心后取贫血小板血浆;(2) 取两名以上正常人的血浆等量混合后分装,得到正常混合标准血浆。

一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于酶联免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 技术,具体涉及一种检测血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子活性的试剂盒,采用抗血小板糖蛋白(glycoprotein, GP)Ib α 单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) SZ-151 作为包被抗体来捕捉结合真核表达重组人 GPIb α 氨基端 His¹-Val²⁸⁹ 片段的 -Fc 融合蛋白 (rfGPIb α H1-V289-Fc),再捕获血浆中的血管性血友病因子 (VWF),然后应用酶标检测仪检测血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子活性。

背景技术

[0002] 血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)是一种大分子的具有粘附功能的多聚体糖蛋白,在初期止血过程中发挥着重要作用。它既可与血小板受体糖蛋白(GP)Ib/IX/V、GP II b/ III a 结合,又能与胶原等细胞外基质 (ECM) 结合,从而介导血小板的粘附与聚集。而且 vWF 还能与凝血因子VIII结合,保护因子VIII免受 APC 灭活。vWF 量的减少或质的异常均能导致血管性血友病 (von Willebrand's diseases, vWD) 的发生。

[0003] 血管性血友病 (von willebrand's disease, vWD) 是最常见的一种遗传性出血性疾病,国外文献报道 vWD 发病率为 0.1%-1%,其发病机制为患者的 vWF 基因突变,导致血浆中 vWF 数量减少或质量异常。vWD 主要分为 3 型,其中 1 型与 3 型为量的减少,2 型为质的异常。2 型又可进一步分为四种亚型 (A, B, M 和 N)。(1)2A 型为 vWF 前体装配异常或对蛋白水解酶的敏感性增加导致缺乏 vWF 高、中分子多聚体缺乏;(2)2B 型发病机制为 vWF 与血小板膜 GP I b 亲和性增加以致自发结合,导致血小板聚集、减少, vWF 清除加速,特征为缺乏 vWF 高分子多聚体;(3)2M 型是由于 vWF 基因 A1 区突变,导致对血小板膜 GP I b 亲和性降低, vWF 多聚体分析正常;(4)N 型特征为 vWF 基因 D' 区或 D3 区突变,导致与因子VIII亲和力和力降低,血浆 F VIII 失去保护而被降解。

[0004] 在大部分国家,疑似 vWD 患者的筛查试验包括:出血时间 (BT), vWF 抗原水平 (vWF:Ag) 和 vWF 瑞斯托霉素辅因子活性试验 (vWF:RCof) 等。要做出准确、恰当的治疗尚需结合其他分型试验如瑞斯托霉素诱导的血小板聚集 (RIPA)、胶原结合试验 (vWF:CB)、vWF 多聚体凝胶电泳和基因分析等。现有实验室检查方法各有一定局限性,因此不能仅凭单项实验做出可靠的诊断,需组合应用一系列检测方法才能较好地对 vWD 进行筛查、诊断和分型。vWF:Ag 试验可较好的反映 vWF 量的异常但无法体现出 vWF 质的缺陷,其结果有助于诊断所有 3 型和大部分 1 型患者,由于部分 2 型患者 vWF:Ag 水平可能正常,因此该实验仅能辅助诊断部分 2 型患者。对于 2 型患者,反映 vWF 功能的主要试验 vWF:RCof 就变得尤为重要。

[0005] 瑞斯托霉素是一种抗生素,可诱导 vWF 和血小板 GPIb/V/IX 复合物的结合。已证实与 vWF 的 A1 区结合的部位为血小板 GPIb α 氨基末端分子量 42kD 的片段 (H1-V289)。国内目前主要应用血液凝集仪检测 vWF :Rcof,该方法需使用血小板聚集仪,其主要将固定正常血小板,患者血浆及一定浓度瑞斯托霉素混合,测定血小板凝集情况。由于该方法使用固

定的正常血小板,存在重复性较差、批内变异和批间变异都较大的固有缺点,且血小板聚集程度有时难以判定,因此常导致部分 vWD 患者的误诊。

[0006] 2000 年 Vanhoorelbeke 等首次报道了应用抗 GPIb α 单克隆抗体 2D4 包被 96 孔聚苯乙烯酶标板,加入重组的 GPIb α ,在小剂量瑞斯托霉素存在下建立了血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子活性测定的酶联免疫分析(vWF:Rcof - ELISA);国内 2007 年徐海燕等应用该进口抗体 2D4 也报道了该方法:vWF:Rcof-ELISA 法建立,以抗 GPIba 的单克隆抗体 2D4 为包被抗体,捕获重组的 GPIba 氨基端片断(v GPIba),该片段在瑞斯托霉素存在的情况下与 vWF 结合(参见:徐海燕. 血管性血友病分型组合实验的建立和临床应用.《苏州大学》2007 年硕士论文)。

[0007] 但是,现有技术中至今未见商品化的 vWF:Rcof - ELISA 诊断试剂盒。

发明内容

[0008] 本发明的发明目的是提供一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒。

[0009] 为达到上述发明目的,本发明采用的技术方案是:一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒,包括:固相化包被抗体的酶标板,辣根过氧化物酶标记的检测抗体,标准品,瑞斯托霉素,重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白(rfGPIb α H1-V289-Fc),样品稀释缓冲液,显色液,终止液,其中,所述包被抗体为抗血小板膜糖蛋白 Ib α 的单克隆抗体 SZ-151;所述检测抗体为兔抗人 VWF 多抗(RAH-vWF-HRP);所述标准品为混合标准血浆;

所述单克隆抗体 SZ-151 由杂交瘤细胞 SZ-151 制备得到,所述杂交瘤细胞 SZ-151 的保藏信息为:保藏日期:2011 年 5 月 24 日;保藏单位:中国典型培养物保藏中心;保藏地址:中国武汉武汉大学;保藏编号:CCTCC C201131;分类命名:杂交瘤细胞 SZ-151。

[0010] 上述技术方案中,所述重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白 rfGPIb α H1-V289-Fc 可参考文献:杨剑峰,抗血小板膜糖蛋白 Ib α 单克隆抗体的人源化及基于膜糖蛋白 Ib α 结构的活性小分子化合物研究,2010 年苏州大学内科血液病学专业博士论文,P48。

[0011] 上述技术方案中,所述检测抗体为兔抗人 VWF 多抗 RAH-vWF-HRP 可参见文献:Vanhoorelbeke K, et al, 2000, Thromb Haemost, 83:107-13。

[0012] 上述技术方案中,所述固相化包被抗体的酶标板为单抗 SZ-151 固相化的酶标板,即表示抗血小板膜糖蛋白 Ib α 的单克隆抗体 SZ-151 已包被在酶标板上,所述酶标板选自但不限于可拆卸的 96 孔聚苯乙烯酶标板。所述设有固相化的抗人血小板膜糖蛋白(GP) Ib α 的单克隆抗体 SZ-151 的 96 孔聚苯乙烯酶标板,即每一个孔内都包被上 SZ-151 IgG,每一个孔内的 SZ-151 IgG 能够在体外分别特异性捕捉结合重组真核表达重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白(rfGPIb α H1-V289-Fc) 抗原分子。

[0013] 上述技术方案中,所述样品稀释缓冲液为含有质量分数 0.2% 的 BSA 的 PBS 缓冲液;所述显色液为 TMB 显色液;所述终止液为 3M 的硫酸溶液。

[0014] 上述技术方案中,正常混合标准血浆的制备方法为:(1) 取外周静脉血,采用枸橼酸三钠抗凝,离心后取贫血小板血浆(PPP);(2) 取两名以上正常人的血浆等量混合后分

装,得到正常混合标准血浆,置-80℃备用。

[0015] 优选的技术方案中, SZ-151 包板浓度为 10 μg/mL, 重组 GPIIb/IIIa H1-V289 片段-Fc 融合蛋白 rfGPIIb/IIIa H1-V289-Fc 浓度为 4 μg/mL, 瑞斯托霉素浓度为 760 μg/mL。

[0016] 应用上述试剂盒检测血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子活性的方法, 包括以下步骤:

(1) 取单抗 SZ-151 固相化的酶标板, 每孔加入 100 μl 重组 GPIIb/IIIa H1-V289 片段-Fc 融合蛋白 (rfGPIIb/IIIa H1-V289-Fc), 4℃静置过夜;

(2) 以洗液洗板 6 次 (TBS (0.02 mol/L Tris-HCl, pH7.4)-0.1% Tween-20 洗涤 6 次), 取正常混合标准血浆, 用样品稀释缓冲液按照 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 共 7 个倍比稀释, 稀释后的以 50 μL/孔加入 ELISA 板; 将枸橼酸三钠抗凝的待测血浆用样品稀释缓冲液按照 1:50 稀释, 稀释后的以 50 μL/孔加入 ELISA 板; 同时按照 50 μL/孔的用量加入终浓度 760 μg/mL 的瑞斯托霉素; 同时设立空白对照孔, 所述空白对照孔为 0.01 mol/L pH7.4 TBS-1 mL/L Tween-20; 37℃温育 2 小时;

(3) 以洗液洗板 6 次, 每孔再加入 100 μl 辣根过氧化物酶标记兔抗人 vWF 多抗 (RAH-vWF-HRP), 37℃温育 1 小时;

(4) 以洗液洗板 9 次, 每孔加入 100 μl 显色液, 显色 10 分钟;

(5) 按照 50 μl/孔的用量加入终止液以终止反应, 在酶标仪上 450 nm 处测定各孔光吸收 (OD 450 nm) 值;

(6) 计算和结果判定: 以正常混合血浆的 7 个倍比稀释度的对数为横坐标, 相应 OD_{450 nm} 值为纵坐标, 作标准曲线和直线回归方程后计算含量; 以正常混合标准血浆的 vWF:Rcof 定为 100 U/dL, 根据标准曲线和直线回归方程, 根据待测血浆测定的 OD 值计算出待检测孔内 vWF:Rcof, 再乘上 50 (待测样本的稀释倍数), 即为待测血浆内的 vWF:Rcof。

[0017] 进一步的技术方案中, 采用现有技术测得待测血浆的 vWF:Ag 以及 vWF:CBA, 结合上述待测血浆的 vWF:Rcof 比值判定血管性血友病的分型, 具体方法为: (vWF:Rcof)/(vWF:Ag) 比值常用于区分 1 型和 2 型 vWD, 1 型患者该比值一般大于 0.6, 2 型患者该比值一般小于 0.6; vWD, 3 型患者, 其 vWF:Ag, vWF:Rcof 和 vWF:CBA 均小于 5 U/dL。

[0018] 由于上述技术方案运用, 本发明与现有技术相比具有下列优点:

(1) 本发明中包被抗 GPIIb/IIIa 单抗 SZ-151 由本发明人研制, 具有自主知识产权, 使得本试剂盒国产化, 降低了试剂成本, 与国外的抗 GPIIb/IIIa 单抗 2D4 包板所测结果进行对比, 结果显示两种方法检测 vWF:Rcof 较为相符 ($r=0.96$)。该方法具有较好的重复性 (批内和批间差异分别为 8% 和 12%), 且灵敏度更高 (其 DL 为 0.01 U/dL)。

[0019] (2) 该方法检测结果与 vWF:Ag ($r = 0.91$) 和 vWF:CBA ($r = 0.85$) 具有良好的相关性。

[0020] (3) 该方法血浆用量少, 只需 5 μl。对于 vWF 抗原水平极低的患者, 由于该方法灵敏度更高, 因此可为其提供更准确的诊断和分型依据。

[0021] (4) 我们用未经过纯化的表达 rfGPIIb/IIIa 的 CHO 培养上清液代替纯化的 rfGPIIb/IIIa 蛋白进行 vWF:Rcof-ELISA 试验, 同样具有较好的结果, 这提示今后或可直接使用未纯化的 CHO 培养上清液, 简化试验步骤并避免 rfGPIIb/IIIa 蛋白在纯化过程中的损失, 节省成本。

附图说明

[0022] 杂交瘤细胞 SZ-151 的保藏信息为:保藏日期:2011 年 5 月 24 日;保藏单位:中国典型培养物保藏中心;保藏地址:中国武汉武汉大学;保藏编号:CCTCC C201131;分类命名:杂交瘤细胞 SZ-151;

- 图 1 为实施例六中不同瑞斯托霉素浓度的测试效果;
- 图 2 为实施例六中两种试剂盒的测试灵敏度对比图;
- 图 3 为实施例六中两种试剂盒的测试结果相关性图;
- 图 4 为实施例七中 vWF:RiCof 与 vWF:Ag 相关性图;
- 图 5 为实施例七中 vWF:RiCof 与 vWF:CBA 相关性图。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

实施例一:制备杂交瘤细胞株 SZ-151。

[0024] 使用正常人混合血小板作为免疫原,常规三次免疫接种 8 周龄雌性 Ba1b/c 小鼠(每次间隔 4 周),用酶联免疫吸附法(ELISA)检测被免疫动物血清中单克隆抗体的存在和浓度。免疫完成后,选择产生足够高浓度(血清内抗体效价为 1:20000 以上)抗血清的小鼠,分离动物脾脏并制备脾细胞悬液。

[0025] 按照已知的杂交瘤技术(Kohler and Milstein, Nature 215:495-497,1975; Kohler et al, Immunology Today, 4:72-76,1983)将所得到的小鼠脾细胞与适当的骨髓瘤(SP2/0)相融合,应用 ELISA 法和 Western 印迹法等生化和免疫学技术筛选和鉴定后,挑选出具有高抗体分泌水平的杂交瘤,制备得到可持续传代并分泌抗血管性血友病因子 A3 区单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0026] 上述杂交瘤细胞系已于 2011 年 5 月 24 日将产生并分泌本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞株保存在中国典型培养物保藏中心,其保藏登记号为 CCTCC C201131。

[0027] 实施例二:纯化单抗 SZ-151。

[0028] 按照常规技术制备单抗 SZ-151 腹水,在 PH8.0,0.1M 的 PBS 缓冲液中透析,8000rpm 离心,取腹水上清约 1ml 过柱(亲和层析柱 Protein G-Sepharose 4B)使各 IgG 与蛋白 G 充分结合,用 0.1M pH2.8 甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱,收集各单抗 IgG 峰。收集 IgG 用 PEG(分子量约 20000)浓缩,在 0.01MPBS 中透析 4 小时,用 280nm 测蛋白含量,SZ-151-IgG 冻低温冰箱备用。

[0029] 实施例三:SZ-151 IgG 固相化包被酶标板。

[0030] 将抗 GPIb α 单克隆抗体 SZ-151-IgG 用包被缓冲液(0.1M, pH9.6 碳酸缓冲液)稀释,以 10 μ g/mL 加入 96 孔聚苯乙烯酶标板孔中,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C 湿盒过夜;次日,用 PBS-0.05% Tween 洗涤 3 次后,用封闭液(2% BSA-PBS) 250 μ l/孔封闭,4 $^{\circ}$ C 湿盒过夜;次日,同上洗涤 3 次后备用或-20 $^{\circ}$ C 冻存。

[0031] 实施例四:重组 GPIb α H1-V289-Fc 片段-Fc 融合蛋白(rfGPIb α H1-V289-Fc)的真核表达、纯化。

[0032] 将稳定表达重组人 GPIb α 氨基端 His¹-Val²⁸⁹ 片段的-Fc 融合蛋白(rfGPIb α H1-V289-Fc)的 CHO 细胞用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液 37 $^{\circ}$ C 培养,细胞生长旺盛后弃去

上清,加入 SFM 培养基继续培养五天,收获上清,将高表达 rGPIb α H1-V289 的培养上清液用 Protein A - Sepharose 4B 亲和层析柱纯化。

[0033] 实施例五:正常混合标准血浆的制备。

[0034] 取外周静脉血 2ml,枸橼酸三钠(1:9)抗凝,3000 rpm/min,离心 10 min,取贫血小板血浆(PPP)。本研究取 40 名正常献血员的血浆等量混合后分装,置-80℃备用,为正常混合标准血浆。

[0035] 待测血浆分离方法同上。

[0036] 实施例六:

一种 vWF:Rcof - ELISA 试剂盒,包括以下组分:

(1) 单抗 SZ-151 固相化的酶标板,抗血小板膜糖蛋白 Ib α 的单克隆抗体 SZ-151 已包被在可拆卸的 96 孔聚苯乙烯酶标板上;

(2) 重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白(rfGPIb α H1-V289-Fc)纯品一瓶,10 ml, 4 μ g / ml;

(3) 混合的标准血浆 4 瓶,50 μ l / 瓶;

(4) 瑞斯托霉素一瓶,5 ml,1.5 ~ 2mg / ml;

(5) 辣根过氧化物酶标记的兔抗人 vWF 多抗(RAH-vWF-HRP),10ml;

(6) 样品稀释缓冲液(0.2% BSA-PBS)一瓶,10 ml;

(7) TMB 显色液一瓶,10 ml;

(8) 终止液一瓶(3M H₂SO₄),5 ml。

[0037] (一)、确定上述试剂盒的最佳瑞斯托霉素浓度:正常混合标准血浆分别作 1/32 ~ 1/512 稀释后,分别以终浓度为 1 mg/ml,760 μ g/ml,500 μ g/ml 和 250 μ g/ml 瑞斯托霉素 37℃温育 2 小时后,测定 vWF:Rcof;所述测定 vWF:Rcof 的方法包括以下步骤:

(1) 取单抗 SZ-151 固相化的酶标板,每孔加入 100 μ l 重组 GPIb α H1-V289 片段-Fc 融合蛋白,4℃湿盒过夜;

(2) 次日,以 TBS(0.02 mol/L Tris-HCL, pH7.4)-0.1%Tween-20 洗涤 6 次,正常混合标准血浆分别作 1/32 ~ 1/512 稀释后,按 50 μ l / 孔的量加入酶标板;同时加入瑞斯托霉素 50 μ l / 孔,终浓度分别为 1 mg/ml,760 μ g/ml,500 μ g/ml 和 250 μ g/ml;空白对照孔为 0.01mol/L pH7.4 TBS-1mL/L Tween-20,37℃温育 2 小时;

(3) 同上洗涤 6 次;每孔再加入 100 μ l 辣根过氧化物酶标记兔抗人 vWF 多抗,37℃温育 1 小时;

(4) 同上洗涤 9 次,每孔加入 100 μ l 显色液 TMB,显色 10 分钟了;

(5) 以 50 μ l / 孔的用量加入终止液以终止反应,在酶标仪上 450 nm 处测定各孔光吸收(OD 450 nm)值;

(6) 计算和结果判定:以正常混合血浆的 7 个倍比稀释度的对数为横坐标,相应 OD450 nm 值为纵坐标,作标准曲线和直线回归方程后计算含量。结果显示瑞斯托霉素浓度为 1 mg/ml 和 760 μ g/ml 时测定的稀释血浆的 vWF:Rcof 明显高于 500 μ g/ml 和 250 μ g/ml 的 vWF:Rcof。我们选择瑞斯托霉素 760 μ g/ml 为试验浓度(图 1)。

[0038] (二)、测定上述 vWF:Rcof - ELISA 试剂盒的灵敏度:分别用抗 GP I b α 单抗 SZ-151 和国外进口的单抗 2D4 包板,正常混合血浆作 1:50 ~ 1:12800 九个倍比稀释度,同

样采用上述方法检测 vWF:RCof,并以混合血浆的 vWF:Rcof 定为 100 U/dL。

[0039] 结果显示 SZ-151 包板的灵敏度为 0.03 U/dL(图 2),高于 2D4 包板(0.05 U/dL)。

[0040] (三)、测定上述 vWF:Rcof - ELISA 试剂盒的重复性:

(1) 批内重复性:同一份标本在相同条件下重复测定 10 次,观察批内重复性。(2) 批间重复性:同一正常献血员标本在不同时间、相同条件下进行重复试验 10 次,观察批间重复性。

[0041] 结果表明:SZ-151 包板测定血浆 vWF:RiCof 的批内差异和批间差异分别为 7.8% 和 9.4%,而同等条件下,2D4 包板的批内差异和批间差异分别为 9.6% 和 12.8%。

[0042] (四)、测定上述 vWF:Rcof - ELISA 技术(SZ-151 包板)与 2D4 包板方法的相关性:

结果如图 4 所示,表明上述 vWF:Rcof - ELISA 技术(SZ-151 包板)与 2D4 包板方法具有良好的相关性,其结果经直线回归分析得 $r=0.96$ (图 3),可见所述单抗 SZ-151 完全可以替代 2D4 包板用于检测 vWF:RiCof。

[0043] (五)、用未经过纯化的表达 rfGPIb α 的 CHO 培养上清液代替纯化的 rfGPIb α 蛋白进行 vWF:RCof-ELISA 试验,同样具有较好的结果,这提示今后或可直接使用未纯化的 CHO 培养上清液,简化试验步骤并避免 rfGPIb α 蛋白在纯化过程中的损失,节省成本。

[0044] 实施例七:临床标本采集和正常人及 vWD 患者的血浆 VWF:RCof 与 vWF:CBA、vWF:Ag 的测定和比较。

[0045] 所述 vWF:Ag 测定方法为(奚晓东,等,1988,中华医学检验杂志,12:272-275):

包板:将抗人 vWF 单克隆抗体 SZ-29 溶于包被缓冲液,以 $2\mu\text{g/mL}$ 包被于 96 孔 ELISA 板, $100\mu\text{L/孔}$, 4°C 湿盒过夜;次日,用 PBS-0.05%Tween 洗涤 3 次后,用封闭液 $200\mu\text{L/孔}$ 封闭, 4°C 湿盒过夜;次日同上洗涤 3 次后备用或 -20°C 冻存。

[0046] 检测:正常混合血浆以 1:20、1:50、1:100、1:200、1:500、1:1000 六个稀释度作为标准曲线, $100\mu\text{L/孔}$,待测血浆作 1:50 稀释亦可按实际需要提高或降低稀释度,均以 0.2% BSA-PBS 为稀释液,空白对照孔加入 0.2% BSA-PBS 溶液, 37°C 温育 2 h;同上洗涤 3 次后加入 HRP 标记的抗人 vWF 单抗 -34, $100\mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 2 h;同上洗涤 6 次后以 TMB 显色, $3\text{M H}_2\text{SO}_4$ 终止反应,在酶标仪上测定 450 nm 处各孔 OD 值。以正常混合血浆的 6 个稀释度的对数为横坐标,相应 OD 值为纵坐标,作直线回归方程后计算含量,以混合血浆的 vWF:Ag 定为 100 U/dL。

[0047] 所述 vWF:CBA 测定方法为(徐海燕,等,中华血液学杂志,2007,28:637-639):

包板:将牛皮肤 III 型胶原(Sigma 公司)用包被缓冲液稀释,以 $20\mu\text{g/mL}$ 包被于 96 孔 ELISA 板, $100\mu\text{L/孔}$, 4°C 湿盒过夜;次日,用 PBS-0.05%Tween 洗涤 3 次后,用封闭液 $200\mu\text{L/孔}$ 封闭, 4°C 湿盒过夜;次日同上洗涤 3 次后备用或 -20°C 冻存。

[0048] 检测:正常混合血浆以 1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560 六个倍比稀释度作为标准曲线, $100\mu\text{L/孔}$,待测血浆作 1:200 稀释或根据实际需要确定稀释度,均以 2% BSA-PBS 为稀释液,空白对照孔加入 2% BSA-PBS 溶液, 37°C 温育 2 h;同上洗涤 3 次后加入 HRP 标记兔抗人 vWF 多抗, 37°C 温育 1 h;同上洗涤 6 次后以 TMB 显色, $3\text{M H}_2\text{SO}_4$ 终止反应,在酶标仪上测定 450 nm 处各孔 OD 值。以正常混合血浆的 6 个稀释度的对数为横坐标,相应 OD 值为纵坐标,作直线回归方程后计算含量,以混合血浆的 vWF:CBA 定为 100 U/dL。

[0049] 36 例按国家规定体检合格的健康志愿者(正常组)。vWD 患者 25 例(vWD 组),符合

2008 年美国国家心肺和血液研究所 (NHLBI) 颁布的血管性血友病诊断与治疗指南。

[0050] 分别测定 36 例正常人和 25 例 vWD 患者的血浆中 vWF:RCof 与 vWF:CBA、vWF:Ag 的含量,并分别计算 vWF:RCof/vWF:Ag 和 vWF:RCof /vWF:CBA 的比值(见表 . 1.)。本研究中 36 名正常人血浆 vWF:RCof > 50U/dL (仅两名例外),与 vWF:Ag、vWF:CBA 检测结果一致, vWF:RCof / vWF:Ag 和 vWF:CBA/vWF:Ag 比值接近 1 (均值分别为 0.92 和 1.06)。1 型 vWD 患者 vWF:RCof < 50U/dL (仅 1 名例外,为 57 U/dL),由于 1 型 vWD 主要是 vWF 量的减少而非质的缺失,vWF:Ag 和 vWF:CBA、vWF:RCof 检测结果较为相当,vWF:RCof / vWF:Ag 和 vWF:CBA/vWF:Ag 比值均 > 0.7。2 型 vWD 患者 vWF:RCof 与 vWF:Ag 相比明显更低,vWF:RCof / vWF:Ag 比值均 < 0.6。3 型 vWD 患者其 vWF:RCof、vWF:CBA 和 vWF:Ag 均极低 (<5U/dL)。

[0051] 表 1 36 名健康志愿者和 25 名 vWD 患者的血浆 vWF:RCof、vWF:Ag 及 vWF:CBA(U/dL) 的均值(范围)和比值

例数 (n)	vWF:RCof(U/dL)	vWF:Ag (U/dL)	vWF:CBA (U/dL)	vWF:RCof /vWF:Ag	vWF:CBA /vWF:Ag
正常人 (n=36)	均值: 92 范围: (47-169)	100 (45-168)	105 (47-160)	0.92 (0.62-1.26)	1.06 (0.85-1.24)
1 型 (n=5)	32 (22-57)	37 (29-49)	38 (31-49)	0.83 (0.7-1.16)	1.05 (0.76-1.29)
2A 型 (n=9)	5 (0.6-12)	21 (5-41)	3 (0.6-8)	0.26 (0.08-0.58)	0.21 (0.03-0.67)
2B 型 (n=4)	9 (1.6-20)	26 (4-51)	4 (1-8)	0.31 (0.15-0.40)	0.24 (0.09-0.45)
2M 型 (n=2)	4 (1-7)	20 (7-32)	12 (2-21)	0.2 (0.14-0.21)	0.5 (0.30-0.65)
3 型 (n=5)	0.7 (0.4-1.6)	2.6 (1.4-4.8)	0.8 (0.4-1.7)	0.3 (0.12-0.89)	0.4 (0.08-0.97)

[0052] 经直线回归分析得 vWF:RCof 与 vWF:Ag ($r=0.91$), vWF:RCof 与 vWF:CBA ($r=0.85$) (参见图 4、5), vWF:Ag 与 vWF:CBA ($r=0.80$)。

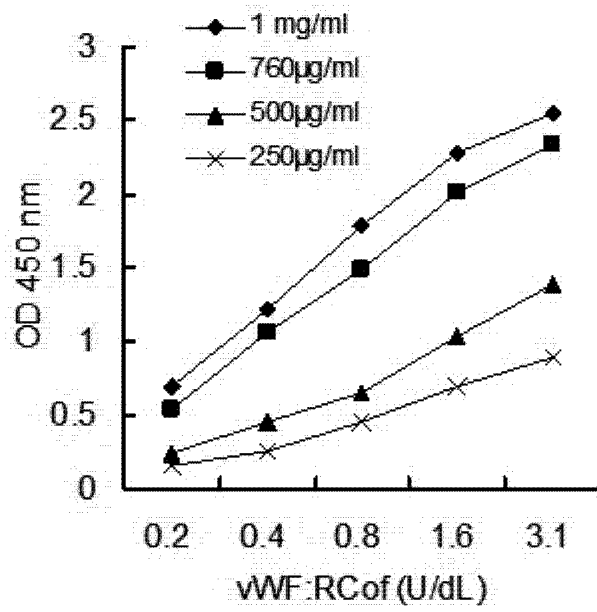


图 1

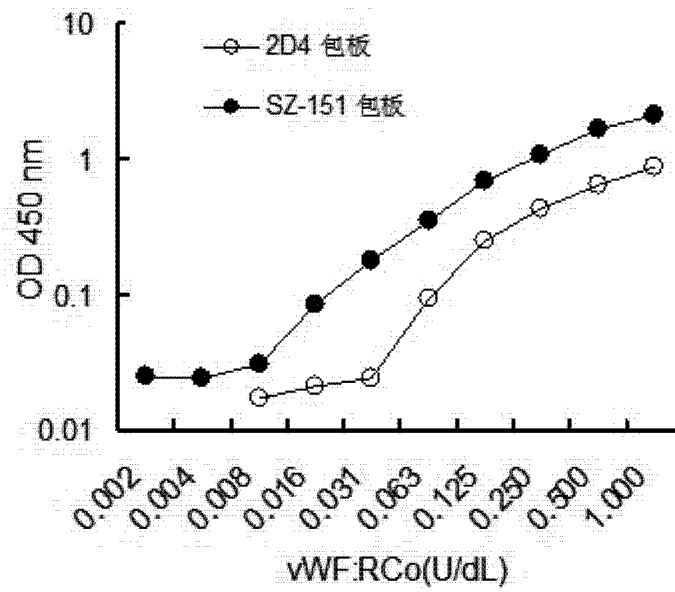


图 2

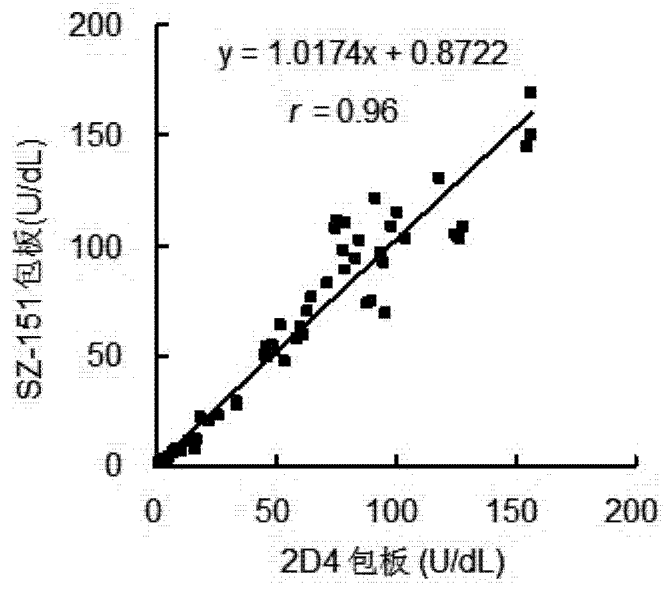


图 3

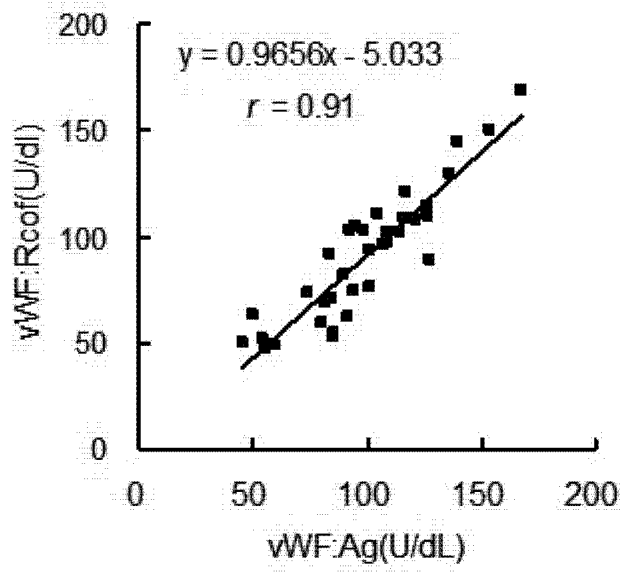


图 4

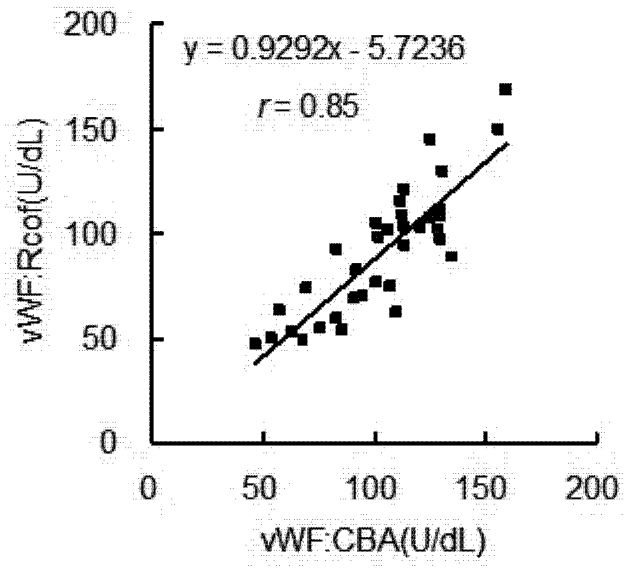


图 5

专利名称(译)	一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN102279273A	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	CN201110202323.5	申请日	2011-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	赵益明 阮长耿 季顺东 杨剑锋		
发明人	赵益明 阮长耿 季顺东 杨剑锋		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/31 G01N33/96		
代理人(译)	陶海锋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血管性血友病因子瑞斯托霉素辅因子酶联免疫试剂盒，包括：固相化包被抗体的酶标板，辣根过氧化物酶标记的检测抗体，标准品，瑞斯托霉素，重组GPIIb/IIIa-V289片段-Fc融合蛋白，样品稀释缓冲液，显色液，终止液，其中，所述包被抗体为抗血小板膜糖蛋白Iba的单克隆抗体SZ-151；所述检测抗体为兔抗人VWF多抗；所述标准品为混合标准血浆。采用该试剂盒检测检测vWF:RCof时具有良好的重复性、灵敏度，且测试结果和vWF:Ag、vWF:CBA具有良好的相关性。

