

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/558

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01106288.6

[43]公开日 2002年10月9日

[11]公开号 CN 1373364A

[22]申请日 2001.3.7 [21]申请号 01106288.6

[71]申请人 吉化集团公司总医院

地址 132022 吉林省吉林市龙潭区大同路32号

[72]发明人 晏舒 曾常茜 尹学念

迟婉莉 李乃奚 栾莹莉

[74]专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责任公司

代理人 丁洪学

权利要求书1页 说明书4页 附图页数0页

[54]发明名称 一种使用免疫PCR技术的红斑狼疮抗Sm抗体的检测方法

[57]摘要

一种使用免疫PCR技术的红斑狼疮抗Sm抗体的检测方法。结合了抗原抗体反应的特异性与PCR扩增技术的优点。步骤是将SmAg抗原包被、封闭、加血清、加探针、加PCR混合物,在PCR扩增仪上扩增。再在水凝胶中电泳,经EB染色,在紫外线反射透射仪上观察结果,照像。使用本发明的积极效果是不仅具有免疫反应的特异性,而且有PCR的高灵敏性,大辅度的提高抗Sm抗体检出率。

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

权 利 要 求 书

一种使用免疫 PCR 技术的红斑狼疮抗 Sm 抗体的检测方法，其特征是：利用酶标软板，在每个孔中加入 1: 1000 ~ 1: 2000 (1000U/ml) 稀释的 SmAg $100\mu\text{l}$ 在 37°C 温度下 1~2h；然后用洗涤液洗涤 3 次，每孔加 $50\mu\text{l}$ ~ $200\mu\text{l}$ 封闭液，在 25~30°C 温度下封闭 30min~1h；取出后再用洗涤液洗涤 3 次，每孔加入 $100\mu\text{l}$ 血清，37°C 温育 40min；取出后再洗涤 3 次，之后加入 1: 1500 ~ 1: 2500 稀释的 SaHIgG-DNA 探针 $100\sim 200\mu\text{l}$ ，37°C 温育 45min；取出，再洗涤 3~5 次，最后加入 PCR 反应混合物，覆盖 $70\mu\text{l}$ 石蜡油，在 PCR 扩增仪上进行扩增，扩增条件为，预变性 94°C 2min 再行 94°C 40sec, 55°C 40sec, 72°C 60sec 共 35 个循环，继续 72°C 延伸 5min；扩增后，取 PCR 扩增产物 $20\mu\text{l}$ 加入到 2% 琼脂糖凝胶中电泳，经 EB 染色，在紫外反射透射仪上观察结果，照相；同时设 PCR 阳性对照，同上法进行 PCR 扩增。

说明书

一种使用免疫 PCR 技术的红斑狼疮抗 Sm 抗体的检测方法

本发明属于抗体的检测方法。

系统性红斑狼疮 (SLE) 是常见的自身免疫病。具有累及多脏器，威胁生命，发病率高等特点，但早期治疗却有较高的治愈率或得到有效的控制。

目前诊断 SLE 的指标有抗 dsDNA 抗体和抗 Sm 抗体，抗 dsDNA 抗体，不仅与 SLE 的活动有关，而且其他疾病也可以检出，抗 Sm 抗体可能是一种回忆性抗体，在 SLE 非活动期也可以检出，是 SLE 的一种标志性抗体，但检出率低。

现有的抗体 Sm 抗体检测方法有 Western-blot 法，CIE 法和 ELISA 法，前两种方法敏感性低，且操作复杂费时，临床应用受到限制，ELISA 法特异性强，但敏感性不高。

PCR 技术是一种基因检测技术，其原理是模拟 DNA 体内复制一种体外核酸扩增过程，这种检测技术具有快速、灵敏、特异的特点。1992 年 PCR 技术开始在免疫分析中应用，免疫 PCR 将抗原抗体反应的特异性与 PCR 扩增结合在一起成为极为敏感的免疫测定技术。

本发明的目的是建立一种用免疫 PCR 技术检测红斑狼疮抗 Sm 抗体的方法，以克服现有的抗 Sm 抗体检测方法的不足之处。

本发明的技术方案是利用酶标软板，在每个孔中加入 1:1000 ~ 1:2000 (1000U/ml) 稀释的 SmAg100 μ l 在 37°C 温度下 1 ~ 2h，然后

用洗涤液洗涤 3 次，每孔加 $50\ \mu\text{l}$ ~ $200\ \mu\text{l}$ 封闭液，在 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 温度下封闭 30min ~ 1h 取出后再用洗涤液洗涤 3 次，每孔加入 $100\ \mu\text{l}$ 血清， 37°C 温育 40min，取出后再洗涤 3 次，之后加入 1: 1500 ~ 1: 2500 稀释的 SaHIgG-DNA 探针 $100\sim 200\ \mu\text{l}$ ， 37°C 温育 45min，取出，再洗涤 3 ~ 5 次，最后加入 PCR 反应混合物，覆盖 $70\ \mu\text{l}$ 石蜡油，在 PCR 扩增仪上进行扩增，扩增条件为，预变性 $94^\circ\text{C} 2\text{min}$ 再行 $94^\circ\text{C} 40\text{sec}$, $55^\circ\text{C} 40\text{sec}$, $72^\circ\text{C} 60\text{sec}$ 共 35 个循环，继续 72°C 延伸 5min，扩增后，取 PCR 扩增产物 $20\ \mu\text{l}$ 加入到 2% 琼脂糖凝胶中电泳，经 EB 染色，在紫外反射透射仪上观察结果，照相，同时设 PCR 阳性对照，同上法进行 PCR 扩增。

使用本发明的积极效果是：敏感性实验结果表明，免疫 PCR 方法检测血清抗 Sm 抗体的敏感性是 ELISA 方法的 10^7 倍。用免疫 PCR 方法对抗 Sm 抗体的检出率明显高于 ELISA 方法 ($P < 0.05$)。用免疫 PCR 方法检测血清标本抗 Sm 抗体结果表明，SLE 患者血清 Sm 抗体阳性率为 54.9%，而其它自身免疫病患者血清和正常对照血清未见此抗体。因此，免疫 PCR 方法检测血清抗 Sm 抗体的特异性强。相关性试验结果表明，免疫 PCR 方法检测血清抗 Sm 抗体与 ELISA 方法呈高度正相关 ($P > 0.001$)。重复性试验结果得到批内和批间 CV 值分别为 2.3 ~ 4.8 % 和 3.7 ~ 6.95%，表明方法稳定、可靠、重复性好。

本发明的实施例：利用 40 孔酶标软板，在每个孔中加入 1: 1500 (1000U/ml) 稀释的 SmAg $100\ \mu\text{l}$ 在 37°C 温度下 1.5h 然后用洗涤液洗涤 3 次，每孔加 $100\ \mu\text{l}$ 封闭液，在 25°C 温度下封闭 45min，取出

后再用洗涤液洗涤 3 次，每孔加入 100 μ l 待检血清 37 $^{\circ}$ C 温育 40min，取出后再洗涤 3 次，之后加入 1: 2000 稀释的 SaHIGg DNA 探针 150 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 45min，取出，再洗涤 5 次，最后加入 PCR 反应混合物，覆盖 70 μ l 石蜡油，在 PCR 扩增仪上进行扩增，扩增条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 2min 再行 94 $^{\circ}$ C 40sec, 55 $^{\circ}$ C 40sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec 共 35 个循环，继续 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min，扩增后取 PCR 扩增产物 20 μ l 加入到 2% 琼脂糖凝胶中电泳，经 EB 染色，在紫外反射透射仪上观察结果，照相，同时设 PCR 阳性对照，同上法进行 PCR 扩增。

本发明所使用的试剂与设备来源是，纯化 SmAg(1000U/ml)、抗 Sm 抗体阳性和阴性血清、SaHIgG-DNA 探针、Taq DNA、引物(p21/p23)、琼脂糖、溴化乙锭 (EB) 均为市场购买。

本发明试剂需经以下配制。

包被缓冲液 (PH9.6 0.1mo/L 碳酸盐缓冲液) :

Na₂CO₃ 4.244g

NaHCO₃ 5.04g

蒸馏水加至 1000ml

PH7.4 0.02mol/L PBS :

NaCL 8g

KH₂PO₄ 0.2g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g

KCL 0.2g

蒸馏水加至 1000ml

封闭液、探针稀释液、血清稀释液:

小牛血清 0.5g ~1ml

PH7.4 0.01~0.02mol/LpBs100ml

洗涤液:

Tween20 0.5ml

PH7.4 0.02mol/L pBs 100ml

5×电泳缓冲液:

Tris 54g

EDTA-Na₂ 0.38g

硼酸 27.5g

蒸馏水加至 1000ml, 用 1mol/L NaOH 调 PH 至 8.0 ,

2%琼脂糖凝胶:

琼脂糖 0.6g

1×电泳缓冲液 30ml

PCR 反应混合物:

10×Buffer 2.5 μ l

2.5mmol/L dNTP 2.0 μ l

P21 2.0 μ l

P23 2.0 μ l

1u/μ lTaq DNA 聚合酶 1.0 μ l

双蒸水 15.5 μ l

专利名称(译)	一种使用免疫PCR技术的红斑狼疮抗Sm抗体的检测方法		
公开(公告)号	CN1373364A	公开(公告)日	2002-10-09
申请号	CN01106288.6	申请日	2001-03-07
[标]发明人	晏舒 曾常茜 尹学念 迟婉莉 李乃奚 栾莹莉		
发明人	晏舒 曾常茜 尹学念 迟婉莉 李乃奚 栾莹莉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种使用免疫PCR技术的红斑狼疮抗Sm抗体的检测方法。结合了抗原抗体反应的特异性与PCR扩增技术的优点。步骤是将SmAg抗原包被、封闭、加血清、加探针、加PCR混合物,在PCR扩增仪上扩增。再在水凝胶中电泳,经EB染色,在紫外线反射透射仪上观察结果,照像。使用本发明的积极效果是不仅具有免疫反应的特异性,而且有PCR的高灵敏性,大辅度的提高抗Sm抗体检出率。