



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108469519 B

(45)授权公告日 2020.03.24

(21)申请号 201810188203.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.03.07

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108469519 A

CN 101063680 A,2007.10.31,

CN 105393119 A,2016.03.09,

CN 103642781 A,2014.03.19,

(43)申请公布日 2018.08.31

CN 1773282 A,2006.05.17,

(73)专利权人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾

大道2076号中国高科大厦六楼A2

CN 104316683 A,2015.01.28,

CN 102331494 A,2012.01.25,

CN 101206222 A,2008.06.25,

(72)发明人 张大准 张永顶 马伟民 王洪涛

马新民

CN 101539579 A,2009.09.23,

CN 103472222 A,2013.12.25,

US 2004185483 A1,2004.09.23,

(74)专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事

务所(普通合伙) 44285

代理人 王仲凯

CN 1913785 A,2007.02.14,

审查员 石剑平

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及酶联免疫技术领域,公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有BSA、聚乙烯醇、甘露醇、叠氮钠和磷酸氢二钠,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、聚乙二醇、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制备的糖尿病检测试剂盒在具有较佳稳定性的基础上,还能够对糖尿病进行准确诊断和分型,特别是针对IAA的检测上,具备较高的阳性率。

1. 一种糖尿病抗体谱检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:

包被有糖尿病自身抗原的蛋白芯片、用酶标稀释液稀释的酶标抗体、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被糖尿病自身抗原后采用封闭液封闭,所述封闭液含有1%BSA的磷酸氢二钠溶液,其中添加了0.8%甘露醇,1%的PVA2W、0.05%的叠氮钠防腐剂,pH值为7.4,余量为水,所述酶标稀释液含有100mM的Tris、50mM的柠檬酸、2.5%的BSA、2%的PEG1W、0.01%的阿拉伯树胶、1%的甜菜碱、以及0.05%的Proclin300,余量为水;

所述包被通过亲和素化的蛋白芯片与生物素化的糖尿病自身抗原相互结合包被;

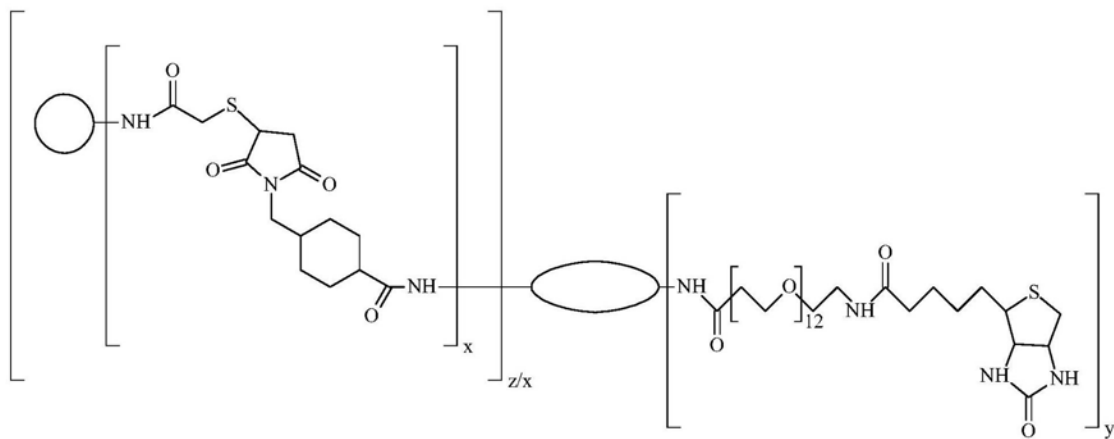
所述生物素化的糖尿病自身抗原包含生物素化的胰岛素,其生物素化过程如下:

准备2mg/mL的胰岛素PBS溶液,配置浓度约为50mmol/L的S-乙酰硫基乙酸琥珀酰亚胺酯的二甲基亚砜溶液,即A溶液,将10微升的A溶液加入到1毫升的胰岛素PBS溶液中混匀室温反应1小时,反应产物在PBS中透析3次后回收得到insulin-SH-P,4度暂存备用;

以PBS为溶剂配置0.5mol/L的盐酸羟胺,其含20mmol/L的EDTA,pH7.0,作为B溶液,在上述1mL的insulin-SH-P中加入100微升的B溶液,混合室温反应1小时,脱盐柱脱盐纯化得到insulin-SH;

准备10mg/mL的人血白蛋白的PBS溶液,配置10mg/mL的Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐的PBS溶液作C溶液,另配置浓度为0.25mol/L琥珀酰亚胺-十二聚乙二醇-生物素的二甲基亚砜溶液作D溶液,将C溶液与D溶液按1:1比例混合后取20微升加入到1mL10mg/mL的人血白蛋白PBS溶液中混匀室温反应1小时,用PBS透析3次纯化得到Biotin-HBA-SMCC;

将上述纯化的insulin-SH与Biotin-HBA-SMCC按体积比10:1混合室温反应30分钟后得到Biotin-大分子蛋白-Insulin,具备式1结构,作为生物素化的insulin抗原;



式 1

其中,圆形表示胰岛素, $1 \leq x \leq n$ ,n表示胰岛素上氨基的数目,x和n均为整数;椭圆代表大分子蛋白, $y+z \leq m$ , $z \geq 10$ , $y \geq 1$ ,m表示大分子蛋白上的氨基数目,y、z和m均为整数,若z/x为非整数,则z/x取整数且在整数位上加1。

2. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述糖尿病自身抗原采用CB缓冲液或Tris缓冲液为抗原稀释缓冲液进行包被。

3. 根据权利要求1或2所述试剂盒,其特征在于,所述蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性

质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上。

4. 权利要求1所述试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

将糖尿病自身抗原在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有糖尿病自身抗原的蛋白芯片,所述封闭液含有1%BSA的磷酸氢二钠溶液,其中添加了0.8%甘露醇,1%的PVA2W、0.05%的叠氮钠防腐剂,pH值为7.4,余量为水;

配制含有100mM的Tris、50mM的柠檬酸、2.5%的BSA、2%的PEG1W、0.01%的阿拉伯树胶、1%的甜菜碱、以及0.05%的Proclin300,余量为水的酶标稀释液并稀释酶标抗体,获得用酶标稀释液稀释的酶标抗体,然后配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得糖尿病抗体谱检测试剂盒。

## 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫技术领域,具体涉及一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 糖尿病(diabetes)是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等等各种致病因子作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征,临床上以高血糖为主要特点,典型病例可出现多尿、多饮、多食、消瘦等表现,即“三多一少”症状。糖尿病在病因,发病机制和自然病程等方面显示高度异质性,所以糖尿病是一组高血糖疾病的总称。糖尿病基于病因和发病机理分为I型糖尿病、II型糖尿病及其它类型。I型糖尿病是以胰岛β细胞自身免疫破坏为重要病因的一种疾病,患者体内存在一种或多种针对胰岛β细胞胰岛素合成、转运和分泌的关键酶的自身抗体,主要包括胰岛细胞抗体(ICA)、胰岛素自身抗体(IAA)、谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、酪氨酸磷酸抗体(IA-2A)、羧基肽酶抗体(CPH-A)和锌转运蛋白8抗体(ZnT8-A)等6种自身抗体。85%~90%患者在首次检出空腹高血糖时,通常存在一种或多种上述抗体。

[0003] 蛋白质芯片是一种高通量的蛋白功能分析技术,是近年来发展起来的一项生物检测技术,这项技术是将蛋白质的分析微缩到小型芯片上,利用荧光或酶显色进行探测,最后用特定的计算机软件加以分析。依靠ELISA技术,蛋白质芯片能够快速、高通量、定量分析大量的蛋白样品,以及所需试剂和样品较少,产品化后价格更低廉等优势,使其迅速成为研究热点。但是,目前该类试剂盒的稳定性并不好。此外,该类试剂盒在检测糖尿病胰岛素自身抗体(IAA)的阳性率上存在不足,阳性率较低,容易漏检。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,使得所述组合物用于制备酶联免疫试剂盒时能够显著提高试剂盒在低温和室温下的稳定性,保存时间延长;

[0005] 本发明的另外一个目的在于提供上述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是用于检测糖尿病的相关试剂盒;

[0006] 本发明的另外一个目的在于提供一种包含上述组合物的糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法,使得所述试剂盒在低温和室温下具有较长时间的稳定性,同时检测结果具有较高的特异性和敏感性;

[0007] 本发明的另外一个目的在于提供一种包含上述组合物的糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法,使得所述试剂盒能够显著提高检测糖尿病胰岛素自身抗体(IAA)的阳性率。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有BSA、聚乙烯醇、甘露醇、叠氮钠和磷酸氢二钠,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、聚乙二醇、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。

[0010] 针对现有酶联免疫试剂盒稳定较差、保存时间较短的缺陷,本发明意外发现了从制备试剂盒的封闭液和酶标稀释液(用于稀释酶标抗原或抗体用)入手,通过选择合适的组分完善两者的组成,能够显著提高酶联免疫试剂盒的稳定性和保存时间。

[0011] 作为优选,所述封闭液含有0.6%-1%BSA,0.8%-1.5%的聚乙烯醇、0.8%-1.5%甘露醇、0.05%叠氮钠和0.01M磷酸氢二钠,pH值为7.4,余量为水,所述百分比为质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述封闭液含有1%BSA,1%的聚乙烯醇、0.8%甘露醇、0.05%叠氮钠和0.01M磷酸氢二钠,pH值为7.4,余量为超纯水。其中,聚乙烯醇优选为聚乙烯醇2W。

[0012] 作为优选,所述酶标稀释液含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2%-3%的BSA、1%-3%的聚乙二醇、0.01%的阿拉伯树胶、0.8%-1.5%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300,余量为水,所述百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述酶标稀释液含有0.1M的Tris、0.05M的柠檬酸、2.5%的BSA、2%的聚乙二醇、0.01%的阿拉伯树胶、1%的甜菜碱以及0.05%的Proclin300。其中,聚乙二醇优选为聚乙二醇1W。

[0013] 本发明利用上述组合物进行糖尿病抗体酶联免疫试剂盒的制备,与采用常规的封闭液和酶标稀释液糖尿病抗体酶联免疫试剂盒相比,在低温(2-8℃)下,本发明试剂盒在放置24个月后就仍然能够保持制备完成时的稳定性,而对照的试剂盒在放置18个月后就出现很大程度的不稳定性;在室温(18-28℃)下,本发明试剂盒在放置6个月后就仍然能够保持制备完成时的稳定性,在放置8个月后就仍然能够保持较高的稳定性,而对照的试剂盒在放置4个月后就出现很大程度的不稳定性。

[0014] 基于上述优异的技术效果,本发明提出了所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是在制备糖尿病酶联免疫检测试剂盒中的应用。

[0015] 同时,本发明还提供一种糖尿病抗体谱检测试剂盒,包括以下组分:

[0016] 包被有糖尿病自身抗原的蛋白芯片、用酶标稀释液稀释的酶标抗体、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被糖尿病自身抗原后采用封闭液封闭,所述封闭液含有BSA、聚乙烯醇、甘露醇、叠氮钠和磷酸氢二钠,所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、聚乙二醇、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300,所述封闭液和酶标稀释液与前述组合物方案相同。

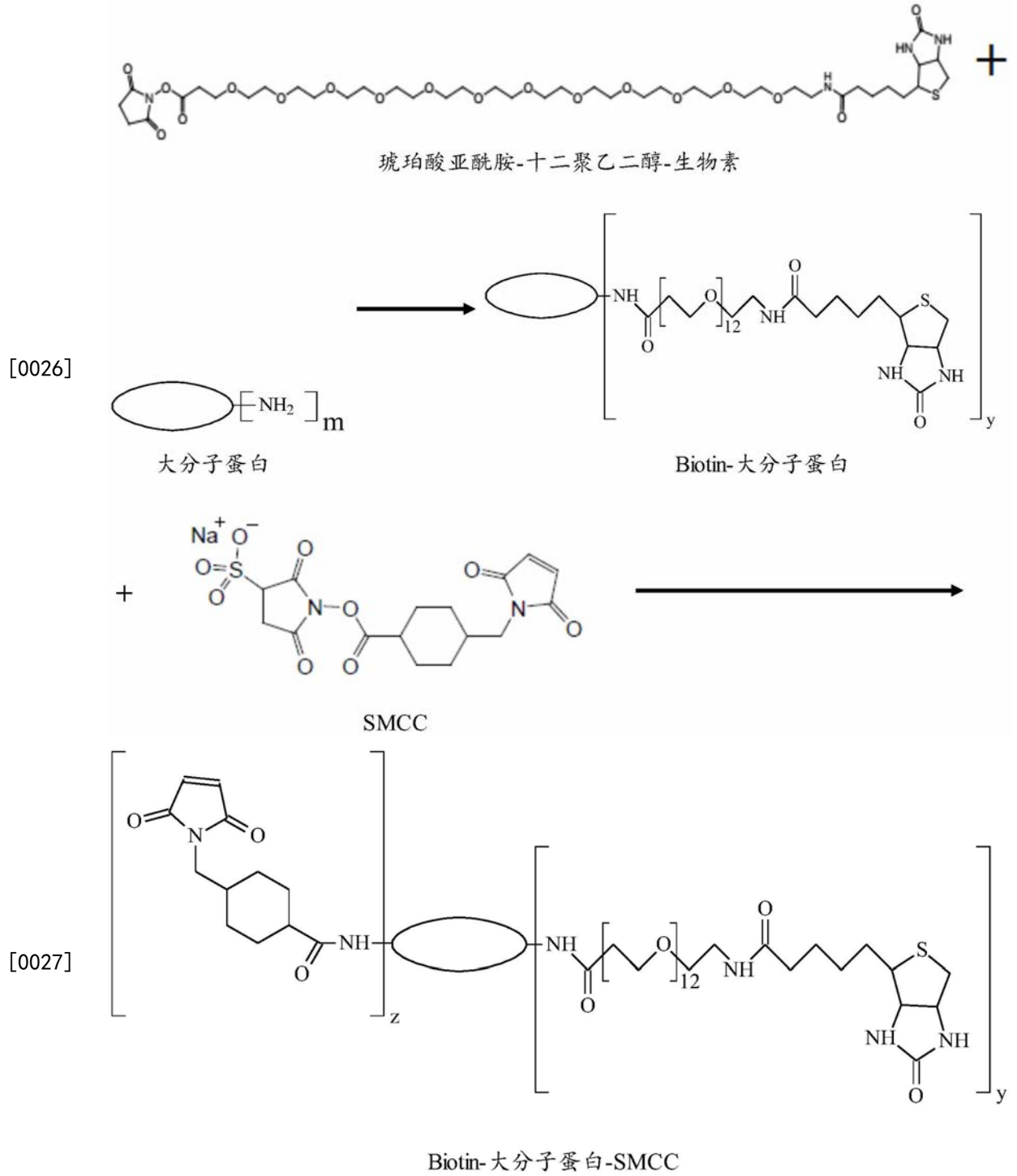
[0017] 作为优选,所属包被通过亲和素化的蛋白芯片与生物素化的糖尿病自身抗原相互结合包被。其中,亲和素优选为链霉亲和素。

[0018] 作为优选,所述糖尿病自身抗原选自IA-2、GAD、IC、CPH、ZnT8、IA中的一种或两种以上;在本发明具体实施方式中,所述糖尿病自身抗原为IA-2、GAD、IC、CPH、ZnT8和IA(在本发明中提到的IA和insulin均表示胰岛素)。

[0019] 在优选的方案中,本发明所述试剂盒的蛋白芯片至少包含生物素化的IA作为糖尿病自身抗原,为了能够提高IA抗体IAA的阳性率,本发明对IA的生物素化方法进行了改进,



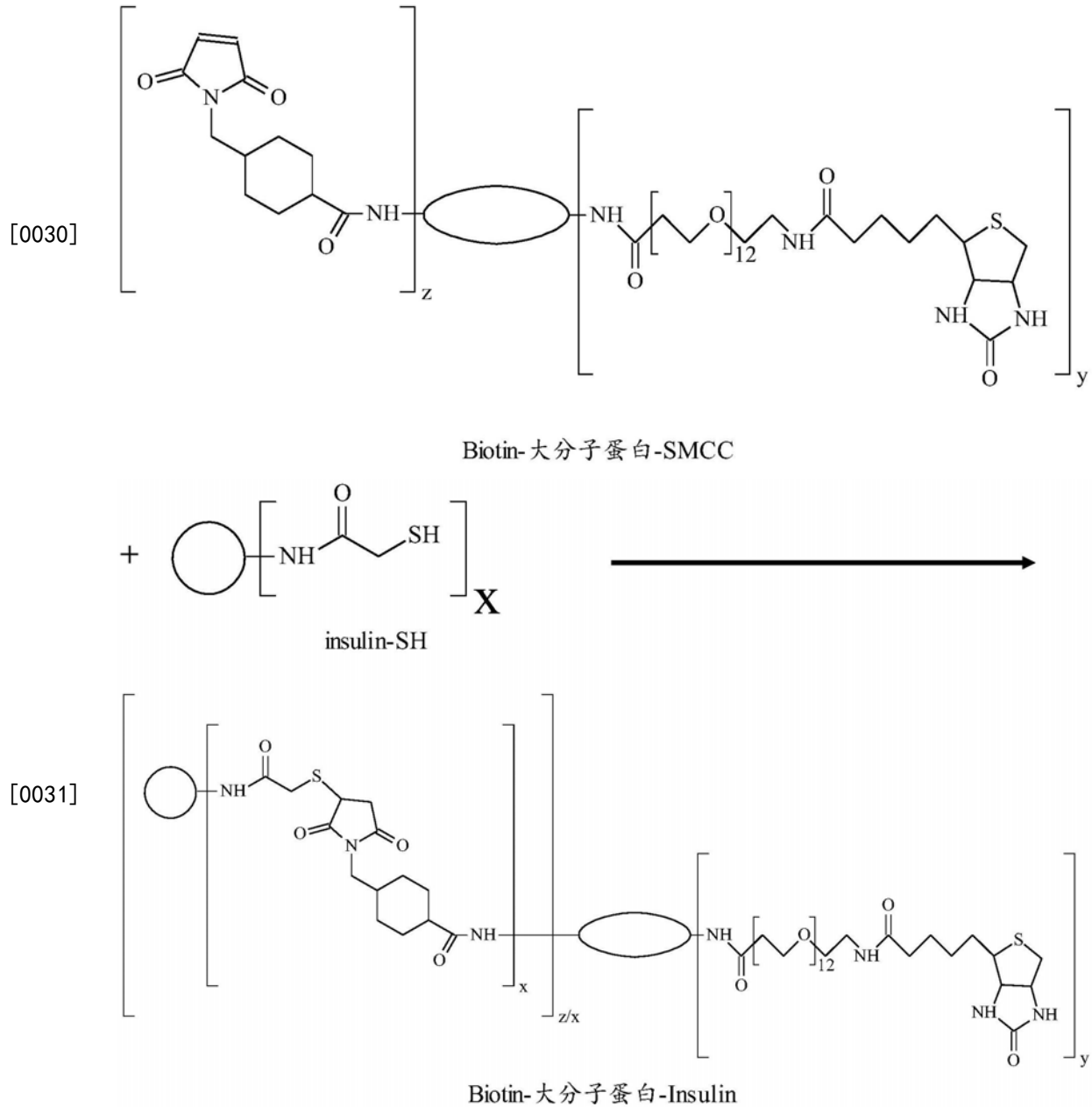
(SMCC, 购自 Thermo) 和琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素室温反应, 经过 PBS 透析 3 次纯化 (副产物是小分子可以透过透析袋, 大分子蛋白不能透过透析袋, 通过多次透析的方式可以除去副产物) 获得 Biotin-大分子蛋白-SMCC, 所述大分子蛋白为 HBA、BSA、OVA 或酪蛋白, 反应式如下:



[0028] 根据上述反应过程, 在添加反应物时, 既可以将大分子蛋白、Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐 (SMCC) 和琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素一同添加完成反应, 也可以先将大分子蛋白和琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素反应, 然后再添加 SMCC 分两步完成, 反应实质不会发生改变。在该步反应中, 椭圆代表大分子蛋白

氨基酸链,  $m$ 表示大分子蛋白氨基酸链上的氨基数目,  $y+z \leq m, z \geq 10, y \geq 1, y, z$ 和 $m$ 均为整数, 若 $z/x$ 为非整数, 则 $z/x$ 取整数且在整数位上加1。

[0029] 步骤2、将备用的insulin-SH和Biotin-大分子蛋白-SMCC混合室温反应, 经过葡聚糖凝胶柱纯化后获得Biotin-大分子蛋白-Insulin, 具有式1所示结构, 作为生物素化的insulin抗原, 反应式如下:



[0032] Biotin-大分子蛋白-Insulin中, 若 $z/x$ 为非整数, 则 $z/x$ 取整数且在整数位上加1。对于本发明特殊生物素化的insulin抗原,  $x$ 无论为1还是为胰岛素上的氨基数目 $n$ , 都不影响在同一个大分子蛋白上连接多个胰岛素的效果, 但 $x=1$ 时所连接的胰岛素数量最多。

[0033] 其中, IA与S-乙酰硫基乙酸琥珀酰亚胺酯分别优选以PBS (优选为pH值为7.0、0.01M的PBS, 以下PBS均优选于此) 和二甲基亚砜为溶剂配制反应溶液, 即IA的PBS溶液, IA浓度为2-4mg/mL; S-乙酰硫基乙酸琥珀酰亚胺酯的二甲基亚砜溶液, S-乙酰硫基乙酸琥珀酰亚胺酯浓度为40-80mmol/L。IA的PBS溶液与S-乙酰硫基乙酸琥珀酰亚胺酯的二甲基亚砜

溶液的体积比为1mL:10 $\mu$ L。

[0034] 含EDTA和盐酸羟胺的PBS中,EDTA浓度为20mmol/L,盐酸羟胺浓度为0.5mol/L,pH值为7.0;insulin-SH-P和含EDTA和盐酸羟胺的PBS的体积比为(6-10):1。

[0035] HBA和Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐优选采用PBS作为溶剂配制反应溶液,琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素以二甲基亚砷为溶剂配制反应溶液,即人血白蛋白(HBA)的PBS溶液,HBA浓度为10-20mg/mL;Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐的PBS溶液,Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐浓度为10-15mg/mL;琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素的二甲基亚砷溶液,琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素的浓度为0.25-0.4mol/L。Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐的PBS溶液与琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素的二甲基亚砷溶液等比例混合溶液与人血白蛋白(HBA)的PBS溶液的体积比为(10-20 $\mu$ L):1mL。

[0036] 在本发明具体实施方式中,上述生物素化的方法可具体如下:

[0037] 准备2-4mg/mL的胰岛素PBS溶液,配置浓度约为40-80mmol/L的S-乙酰巯基乙酸琥珀酰亚胺酯的二甲基亚砷溶液(A溶液),将10微升的A溶液加入到1毫升的胰岛素PBS溶液中混匀室温反应1-4小时,反应产物在PBS中透析3次后回收得到insulin-SH-P,4度暂存备用;

[0038] 以PBS为溶剂配置0.5mol/L的盐酸羟胺(含20mmol/L的EDTA,pH7.0)作为B溶液,按insulin-SH-P和含EDTA和盐酸羟胺的PBS的体积比为(6-10):1,混合室温反应1-2小时脱去保护基团,经葡聚糖凝胶柱纯化后形成含活性巯基基团的insulin-SH;

[0039] 准备10-20mg/mL的人血白蛋白(HBA)的PBS溶液,配置10-15mg/mL的Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐的PBS溶液作C溶液,另配置浓度为0.25-0.4mol/L琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素的二甲基亚砷溶液作D溶液,将C溶液与D溶液按1:1比例混合后取10-20微升加入到1mL 10-20mg/mL的人血白蛋白PBS溶液中混匀室温反应1-2小时,用PBS透析3次纯化得到Biotin-HBA-SMCC;

[0040] 将上述纯化的insulin-SH与Biotin-HBA-SMCC按体积比10:(1-4)混合室温反应30-60分钟后得到Biotin-大分子蛋白-Insulin,作为生物素化的insulin抗原。

[0041] 经过试验验证,采用常规方法获得的生物素化的IA与按照本发明生物素化方法获得的IA,在用于检测时,本发明能够获得更高的IAA阳性率,避免样本因较低浓度而被漏检或错判。

[0042] 在包被中,所述糖尿病自身抗原采用CB缓冲液或Tris缓冲液为抗原稀释缓冲液进行包被;作为优选,所述缓冲液选自PH9.6的CB缓冲液或PH8.5的Tris缓冲液,更优选地,在缓冲液中添加PEG或者PVP,Proclin300,同时添加了水溶性的环糊精,可使包被更稳定、抗原包被点更规则、更圆,CV更小。

[0043] 其中,水溶性环糊精可以是Captisol、2-羟基- $\beta$ -环糊精或羧甲基- $\beta$ -环糊精等,浓度为0.02%;PEG或者PVP的浓度为5%,Proclin300浓度为0.05%,所述百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v)。

[0044] 在本发明具体实施方式中,GAD和CPH的稀释缓冲液为PH8.5的0.02M Tris缓冲液(含5%的PEG、0.05%的Proclin300,0.02%Captisol,以及15%的甘油),终浓度分别为8 $\mu$ g/ml、30 $\mu$ g/ml。

[0045] IA-2、IC、IA、ZnT8的稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液,终浓度分别为10ug/ml、10ug/ml、80ug/ml、15ug/ml。

[0046] 此外,本发明试剂盒中的蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上;更为具体地,至少有一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC);至少一个样品点质控点(SC)和一个酶标质控点(EC);至少3个参考曲线点(S1-S3)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0047] 在具体实施方式中,本发明蛋白芯片上还包含一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC);一个样品点质控点(SC)和一个酶标质控点(EC);3个参考曲线点(S1-S3)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0048] 其中,阳性质控点可以是人IgG,则对应使用的酶标抗体就是抗人IgG的酶标。阳性质控点也可以是包被BSA偶联的DNP,则对应使用的酶标抗体就是抗人IgG的酶标以及抗DNP的酶标的混合液。

[0049] 而阴性质控点可以是低于反应信号值的微量浓度的人IgG,或采用其他的无关蛋白来替代;样品质控点可以是羊抗人的IgG或其他的抗人IgG;酶标质控点可以是人IgG,或其他的抗兔的抗体(酶标用的是兔抗人IgG),例如羊抗兔IgG抗体。所述参考曲线点在具体实施过程中是低、中、高三种浓度的人IgG。

[0050] 蛋白芯片本身的位置参考点是人IgG溶液,主要对蛋白芯片上阵列取值时的定位作用。

[0051] 优选地,上述阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、参考曲线点以及位置参考点也通过预先生物素化与亲和素化的底板包被。

[0052] 本发明所述酶标抗体中酶标记物可选择常规的酶以及对应的显色液,如辣根过氧化物酶和TMB显色剂。

[0053] 本发明还对应提供了所述试剂盒的制备方法,包括:

[0054] 将糖尿病自身抗原在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有糖尿病自身抗原的蛋白芯片,所述封闭液含有BSA、聚乙烯醇、甘露醇、叠氮钠和磷酸氢二钠;

[0055] 配制含有Tris、柠檬酸、BSA、聚乙二醇、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300的酶标稀释液并稀释酶标抗体,获得用酶标稀释液稀释的酶标抗体,然后配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得糖尿病抗体谱检测试剂盒。

[0056] 采用本发明糖尿病抗体谱检测试剂盒检测血清样本,其总抗体在T1MD阳性率为98.21%,T2DM阳性率为10.58%,正常人阳性率仅2.56%,其差别具有显著学意义( $P < 0.01$ )。

[0057] 由以上技术方案可知,本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制备的糖尿病检测试剂盒在具有较佳稳定性的基础上,还能够对糖尿病进行准确诊断和分型,特别是针对IAA的检测上,具备较高的阳性率。

## 附图说明

[0058] 图1所示为本发明所述生物素化的insulin抗原的结构示意图。

## 具体实施方式

[0059] 本发明公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述组合物、试剂盒和应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的组合物、试剂盒和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0060] 以下就本发明所提供的一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法做进一步说明。

[0061] 实施例1:本发明所述糖尿病抗体谱检测试剂盒的制备

[0062] 1、芯片底板和糖尿病自身抗原的预处理

[0063] (1) 芯片的预处理:

[0064] 将稀释了6K倍的链霉亲和素(稀释液为PH7.4的0.01M的PBS),加入96孔板中,50u1/孔,然后于37°C恒温箱中静置2h。

[0065] 取出96孔板,用PBS洗涤3次,最后用纯化水洗涤一次,吸干。洗涤条件:300u1/孔,静置30sec/次。

[0066] 37°C恒温鼓风干燥箱干燥备用。

[0067] (2) 糖尿病自身抗原的预处理:

[0068] 用Thermo的EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin生物素化试剂盒对IA-2、GAD、IC、CPH、ZnT8分别进行生物素化。

[0069] 胰岛素(IA)抗原的生物素化采用改良的技术,具体方案如下:

[0070] 准备2mg/mL的胰岛素PBS溶液,配置浓度约为50mmol/L的S-乙酰巯基乙酸琥珀酰亚胺酯的二甲基亚砷溶液(A溶液),将10微升的A溶液加入到1毫升的胰岛素PBS溶液中混匀室温反应1小时,反应产物在PBS中透析3次后回收得到insulin-SH-P,红外和核磁检测显示与预期结构一致,4度暂存备用;

[0071] 以PBS为溶剂配置0.5mol/L的盐酸羟胺(含20mmol/L的EDTA,pH7.0)作为B溶液,在上述1mL的insulin-SH-P中加入100微升的B溶液,混合室温反应1小时,脱盐柱脱盐纯化得到insulin-SH,红外和核磁检测显示与预期结构一致。

[0072] 准备10mg/mL的人血白蛋白(HBA)的PBS溶液,配置10mg/mL的Sulfo-N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸钠盐的PBS溶液作C溶液,另配置浓度为0.25mol/L琥珀酸亚酰胺-十二聚乙二醇-生物素的二甲基亚砷溶液作D溶液,将C溶液与D溶液按1:1比例混合后取20微升加入到1mL10mg/mL的人血白蛋白PBS溶液中混匀室温反应1小时,用PBS透析3次纯化得到Biotin-HBA-SMCC,红外和核磁检测显示与预期结构一致;

[0073] 将上述纯化的insulin-SH与Biotin-HBA-SMCC按体积比10:1混合室温反应30分钟后得到Biotin-大分子蛋白-Insulin,具备式1结构,作为生物素化的insulin抗原,红外和核磁检测显示与预期结构一致。

[0074] 2、糖尿病自身抗原和相关蛋白的包被

[0075] 蛋白芯片阵列中的PC、NC、S1、S2、S3、EC分别包被的是2ug/ml、0.01ug/ml、0.5ug/ml、2ug/ml、4ug/ml的生物素化(采用前述生物素化试剂盒,下同)人IgG,可用PH9.6的CB缓

冲液(含5%的PEG、0.05%的Proclin300,以及0.02%的Captisol)进行稀释。

[0076] SC点使用的是2ug/ml生物素化羊抗人IgG抗体,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液。

[0077] Loc点使用的是2ug/ml的生物素化人IgG溶液,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液。

[0078] GAD和CPH的稀释缓冲液为PH8.5的20mM Tris缓冲液(含5%的PEG、0.05%的Proclin300,0.02%Captisol,以及15%的甘油),终浓度分别为8ug/ml、30ug/ml。

[0079] IA-2、IC、IA、ZnT8的稀释液为PH9.6的CB缓冲液,终浓度分别为10ug/ml、10ug/ml、80ug/ml、15ug/ml。

[0080] 将稀释好的抗原分别用0.22um的滤膜过滤,然后用BioDot精密点样仪进行阵列的包被。全部阵列完成点样之后,将芯片置于2-8℃,过夜包被24-30h。蛋白芯片阵列可参照如下表呈现的阵列,也可根据实际需要调整,不做限制:

[0081] 表1蛋白芯片阵列

[0082] PC	NC	IC	NC
S1	GAD	IA	SC
S2	CPH	ZnT8	EC
S3	IA-2	PC	Loc

[0083] 3、封闭

[0084] 取出包被的芯片,用PH7.4的PBST洗涤液清洗3次,然后每孔加入150u1的封闭液(PH7.4,含有1%BSA的磷酸氢二钠溶液,其中添加了0.8%甘露醇,1%的PVA2W、0.05%的叠氮钠防腐剂),室温封闭1h,然后拍干,于湿度15%以下,室温放置,干燥4h,后密封、2-8℃保存。

[0085] 4、配制酶标稀释液、酶标抗体、显色液、样品稀释液和浓缩洗涤液

[0086] 酶标稀释液:含有100mM的Tris、50mM的柠檬酸、2.5%的BSA、2%的PEG1W、0.01%的阿拉伯树胶、1%的甜菜碱、以及0.05%的Proclin300;

[0087] 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体;

[0088] 使用时,用酶标稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体稀释至4K倍(酶标抗体浓度)。

[0089] 显色液:沉降型TMB。

[0090] 样品稀释液:0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05%Tween20,0.01%酪蛋白,pH7.4。

[0091] 10倍浓缩洗涤液:0.2M Tris,1.5M NaCl,0.5%Tween20,pH7.4。

[0092] 上述包被有糖尿病自身抗原的蛋白芯片、酶标稀释液稀释的酶标抗体和显色液、以及样品稀释液和10倍浓缩洗涤液组成本发明糖尿病抗体谱检测试剂盒。

[0093] 5、检测方法

[0094] (1)取出蛋白芯片,平衡至室温;

[0095] (2)加样:将阴性和阳性对照血清、以及用样品稀释液稀释了101倍的待测样品,每孔100uL加入待测芯片孔中反应。

[0096] (3)温育:室温静置反应30min。加300uL洗涤液(用超纯水稀释10倍后使用),洗涤3次,每次静置1min。

[0097] (4)加酶标抗体:每孔加入50uL酶标抗体。

[0098] (5)温育:室温静置反应30min。加300uL洗涤液,洗涤3次,每次静置1min。

[0099] (6) 显色:每孔加入TMB显色剂50uL,室温静置,避光反应30min。

[0100] (7) 测定:30min内,用检测仪读取并计算每个反应孔对应抗体的信号值及浓度;其中,信号检测体系也可以是化学发光的方式来实现,可用化学发光底物,如鲁米诺等,然后通过荧光检测装置来进行结果的读取。

[0101] 实施例2:临床样本的检测

[0102] 样本来源:糖尿病患者均来自新近确诊的病人,符合1999年糖尿病诊断标准,其中T1DM患者56例,年龄在6-52岁,T2DM患者104例,年龄在20-56岁,正常人78例,均来自健康体检者,均无糖尿病家族史,年龄在15-55岁。分别抽取静脉血,分离血清,分装后于-20℃冻存,待检。

[0103] 具体的实验结果和数据如下表:

[0104] 表2

组别	n	IA-2A	GADA	ICA	CPH-A	ZnT8-A	IAA	总阳性率
T1DM	56	26	42	17	3	15	14	55/56 (98.21%)
T2DM	104	2	10	1	3	0	2	11/104 (10.58%)
正常组	78	0	0	0	2	0	0	2/78 (2.56%)

[0106] 1型糖尿病 (T1DM) 由自身抗体免疫导致胰岛细胞受破坏,属于胰岛素的绝对不足,而2型糖尿病 (T2DM) 是由胰岛素抵抗产生的,一般跟生活习惯饮食有关,其中能检测到的自身抗体较少。糖尿病的自身抗体在这三种人群的阳性率应该有显著的差异。

[0107] 从本发明实验结果看,用本发明的试剂盒检测血清样本,其总抗体在T1DM阳性率为98.21%,T2DM阳性率为10.58%,正常人阳性率仅2.56%,三组差别具有显著学意义 ( $P < 0.01$ ),符合临床上检测的规律和标准。

[0108] 实施例3:本发明所述试剂盒稳定性检测

[0109] 对照试剂盒:按照实施例1的方法进行制备,区别在于封闭液和酶标稀释液均采用常规的0.01MPBS (PH7.4)+10%BSA;

[0110] 试验试剂盒:实施例1试剂盒;

[0111] 检测方法:将两种试剂盒分别置于室温 (18-28℃) 和低温 (2-8℃) 下放置一段时间,然后采用相同血清按照实施例1检测方法检测,统计仪器信号值,结果见表3-6。

[0112] 1、实施例1试剂盒低温下的稳定性数据

[0113] 表3

抗原对应的抗体	0个月	6个月	6个月/0个月	12个月	12个月/0个月
GADA	43688	43065	98.57%	42626	97.57%
CPH-A	6331	6336	100.08%	6115	96.59%
IA2-A	33625	32908	97.87%	32910	97.87%
ICA	29415	30021	102.06%	29104	98.94%

[0114]

[0115]

IAA	8008	7989	99.76%	7882	98.43%
ZnT8-A	10906	10668	97.82%	10418	95.53%
抗原对应的抗体	12 个月/6 个月	18 个月	18 个月/0 个月	18 个月/6 个月	18 个月/12 个月
GADA	98.98%	41665	95.37%	96.75%	97.75%
CPH-A	96.51%	6064	95.78%	95.71%	99.17%
IA2-A	100.01%	32007	95.19%	97.26%	97.26%
ICA	96.95%	28391	96.52%	94.57%	97.55%
IAA	98.66%	7548	94.26%	94.48%	95.76%
ZnT8-A	97.66%	10210	93.62%	95.71%	98.00%
抗原对应的抗体	24 个月	24 个月/0 个月	24 个月/6 个月	24 个月/12 个月	24 个月/18 个月
GADA	40998	93.84%	95.20%	96.18%	98.40%
CPH-A	6006	94.87%	94.79%	98.22%	99.04%
IA2-A	31425	93.46%	95.49%	95.49%	98.18%
ICA	27065	92.01%	90.15%	92.99%	95.33%
IAA	7203	89.95%	90.16%	91.39%	95.43%
ZnT8-A	9983	91.54%	93.58%	95.82%	97.78%

[0116] 由表3可以看出,本发明试剂盒分别检测了在低温下放置0、6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了24个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、6、12、18个月的检测信号值相比,几乎均处于90%以上,证明本发明所述试剂盒在低温条件下放置24个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0117] 2、实施例1试剂盒室温下的稳定性数据

[0118] 表4

[0119]

抗原对应的抗体	0 个月	2 个月	2 个月/0 个月	4 个月	4 个月/0 个月
GADA	43688	43105	98.67%	42112	96.39%
CPH-A	6331	6258	98.85%	5959	94.12%
IA2-A	33625	33821	100.58%	31558	93.85%
ICA	29415	28815	97.96%	28663	97.44%
IAA	8008	7886	98.48%	7498	93.63%
ZnT8-A	10906	11031	101.15%	10233	93.83%
抗原对应的抗体	4 个月/2 个月	6 个月	6 个月/0 个月	6 个月/2 个月	6 个月/4 个月
GADA	97.70%	40991	93.83%	95.10%	97.34%
CPH-A	95.22%	5765	91.06%	92.12%	96.74%
IA2-A	93.31%	30989	92.16%	91.63%	98.20%
ICA	99.47%	27996	95.18%	97.16%	97.67%
IAA	95.08%	7285	90.97%	92.38%	97.16%

	ZnT8-A	92.77%	10110	92.70%	91.65%	98.80%
	抗原对应的抗体	8个月	8个月/0个月	8个月/2个月	8个月/4个月	8个月/6个月
[0120]	GADA	38091	87.19%	88.37%	90.45%	92.93%
	CPH-A	5065	80.00%	80.94%	85.00%	87.86%
	IA2-A	28989	86.21%	85.71%	91.86%	93.55%
	ICA	24996	84.98%	86.75%	87.21%	89.28%
	IAA	6885	85.98%	87.31%	91.82%	94.51%
	ZnT8-A	9110	83.53%	82.59%	89.03%	90.11%

[0121] 由表4可以看出,本发明试剂盒分别检测了在常温下放置0、2、4、6、8个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了8个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、2、4、6个月的检测信号值相比,均处于80%以上,证明本发明所述试剂盒在常温条件下放置8个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0122] 3、实施例1试剂盒和对照试剂盒低温下的稳定性数据对比

[0123] 表5

	抗原对应的抗体	实施例1	对照	对照/实施例1		抗原对应的抗体	实施例1	对照	对照/实施例1	
[0124]	6个月	GADA	43065	43005	99.86%	12个月	GADA	42626	41418	97.17%
		CPH-A	6336	6261	98.82%		CPH-A	6115	6085	99.51%
		IA2-A	32908	33076	100.51%		IA2-A	32910	31153	94.66%
		ICA	30021	30175	100.51%		ICA	29104	28604	98.28%
		IAA	7989	7886	98.71%		IAA	7882	7586	96.24%
		ZnT8-A	10668	10562	99.01%		ZnT8-A	10418	9986	95.85%
[0124]	18个月	GADA	41665	6328	15.19%	24个月	GADA	40998	738	1.80%
		CPH-A	6064	1668	27.51%		CPH-A	6006	396	6.59%
		IA2-A	32007	5663	17.69%		IA2-A	31425	844	2.69%
		ICA	28391	1672	5.89%		ICA	27065	665	2.46%
		IAA	7548	2052	27.19%		IAA	7203	336	4.66%
		ZnT8-A	10210	681	6.67%		ZnT8-A	9983	309	3.10%

[0125] 由表5可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在低温下放置6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了18个月的对照试剂盒,其检测信号值开始出现显著的下降,结合表3数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0126] 4、实施例1试剂盒和对照试剂盒常温下的稳定性数据对比

[0127] 表6

	抗原对应的抗体	实施例 1	对照	对照/实施例 1		抗原对应的抗体	实施例 1	对照	对照/实施例 1	
[0128]	2 个月	GADA	43105	42901	99.53%	4 个月	GADA	42112	36558	86.81%
		CPH-A	6258	6161	98.45%		CPH-A	5959	4013	67.34%
		IA2-A	33821	31496	93.13%		IA2-A	31558	28964	91.78%
		ICA	28815	27864	96.70%		ICA	28663	20556	71.72%
		IAA	7886	7265	92.13%		IAA	7498	6621	88.30%
		ZnT8-A	11031	10821	98.10%		ZnT8-A	10233	8634	84.37%
6 个月	8 个月	GADA	40991	2695	6.57%	GADA	38091	554	1.45%	
		CPH-A	5765	989	17.16%	CPH-A	5065	265	5.23%	
		IA2-A	30989	1989	6.42%	IA2-A	28989	631	2.18%	
		ICA	27996	1625	5.80%	ICA	24996	324	1.30%	
		IAA	7285	887	12.18%	IAA	6885	209	3.04%	
		ZnT8-A	10110	936	9.26%	ZnT8-A	9110	267	2.93%	

[0129] 由表6可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在常温下放置3、6、9、12个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了4个月的对照试剂盒,其某些指标的检测信号值开始出现显著的下降,结合表4数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0130] 实施例4:本发明所述试剂盒对IAA的阳性率检测试验

[0131] 对照试剂盒:按照实施例1的方法进行制备,区别在于IA的生物素化同样采用EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin生物素化试剂盒;

[0132] 试验试剂盒:实施例1试剂盒;

[0133] 检测方法:选取8个阳性样本,8个弱阳性样本以及5个阴性样本,分别采用上述两种试剂盒按照实施例1检测方法检测,统计仪器信号值,结果见表7。

[0134] 表7

		实施例 1 试剂盒	对照试剂盒	
[0135]	对样本的检测结果	阳性 1	8968	7667
		阳性 2	8864	5580
		阳性 3	10056	8876
		阳性 4	13258	9685

[0136]	阳性 5	26585	20421
	阳性 6	11627	10668
	阳性 7	9688	6105
	阳性 8	11571	8864
	弱阳性 1	5501	4165
	弱阳性 2	4773	4017
	弱阳性 3	4685	3363
	弱阳性 4	3963	1801
	弱阳性 5	5250	3968
	弱阳性 6	4862	2035
	弱阳性 7	6018	3361
	弱阳性 8	5359	2088
	阴性 1	678	658
	阴性 2	465	505
	阴性 3	602	461
	阴性 4	388	429
	阴性 5	587	603

[0137] 由表7可以看出,与本发明中对IA的生物素化的方法比较,采用一般的生物素化试剂盒对IA进行生物素化对阳性样本的检测效果不如本发明中采用的方法,使用本发明这种对IA的生物素化方法可以大幅提高IAA的阳性率,效果比使用一般的生物素化试剂盒明显要好。

[0138] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

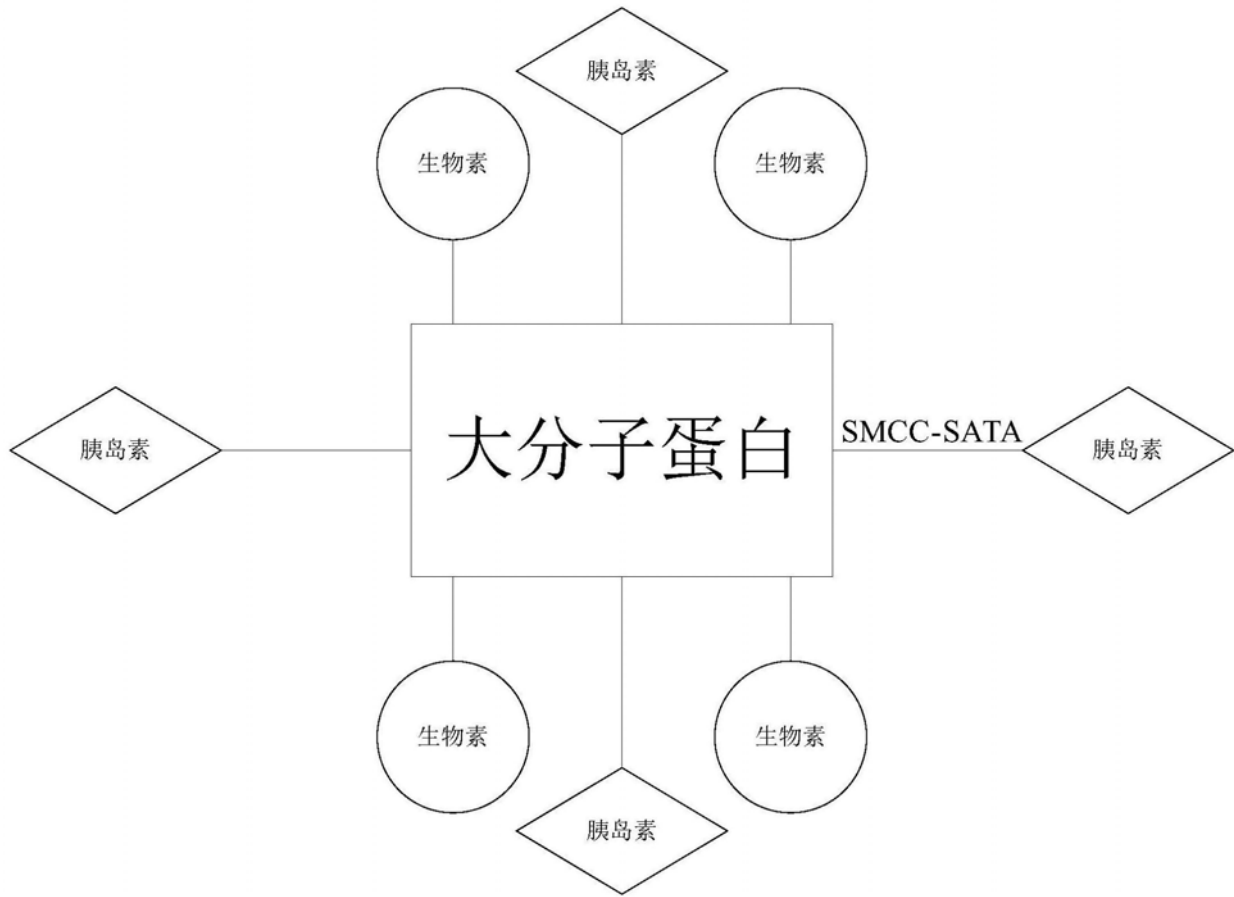


图1

专利名称(译)	一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108469519B</a>	公开(公告)日	2020-03-24
申请号	CN201810188203.6	申请日	2018-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
[标]发明人	张大准 张永顶 马伟民 王洪涛 马新民		
发明人	张大准 张永顶 马伟民 王洪涛 马新民		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6893 G01N2800/042 G01N33/564		
代理人(译)	王仲凯		
其他公开文献	CN108469519A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及酶联免疫技术领域，公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及糖尿病抗体谱检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包括封闭液和酶标稀释液；所述封闭液含有BSA、聚乙烯醇、甘露醇、叠氮钠和磷酸氢二钠，所述酶标稀释液含有Tris、柠檬酸、BSA、聚乙二醇、阿拉伯树胶、甜菜碱和Proclin300。本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手，通过选择适宜成分，使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时，以所述组合物制备的糖尿病检测试剂盒在具有更佳稳定性的基础上，还能够对糖尿病进行准确诊断和分型，特别是针对IAA的检测上，具备较高的阳性率。

