

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410093354.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 7 月 5 日

[11] 公开号 CN 1796997A

[22] 申请日 2004.12.22

[21] 申请号 200410093354.1

[71] 申请人 上海富纯中南生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路 899 号 B 座 207 室

[72] 发明人 倪 健 杨子义 魏国兰 罗 鹏

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司
代理人 丁纪铁

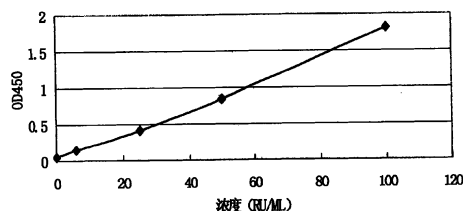
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称

诊断 RA 的检测试剂盒、制备及完成质量检测标准的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于类风湿性关节炎的诊断试剂盒及其制备及完成质量检测标准的方法。所述试剂盒是检测抗环瓜氨酸肽抗体的检测试剂盒。检测试剂盒的制备方法包括包被抗原、制备对照物和配制液体试剂。所述质量检测标准包括成品逐批检定标准和成品周期检定标准。本发明的试剂盒具有很高的阳性预测值，并且操作简便，敏感度高，且能用于大批样品的快速检测，还可同时对抗 CCP 抗体进行定性和定量检测，满足不同需要。



1、一种诊断早期类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒是检测抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体的检测试剂盒。

2、根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括盒体、设在盒体内的酶标板、对照物和液体试剂,并且在酶标板的每个孔内有包被液包被、且被无关蛋白或血清封闭的特异性抗原CCP的分枝抗原肽(MAP)结构。

3、根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,可用于定性和定量分析。

4、根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,试剂盒中设有标准曲线。

5、根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,包被抗原是CCP及其相关结构。

6、根据权利要求5所述的检测试剂盒,其特征在于,所述CCP相关结构是CCP的分枝抗原肽(MAP)结构。

7、根据权利要求6所述的检测试剂盒,其特征在于,所述CCP的分枝抗原肽结构是以多聚赖氨酸(poly-Lys, PL)为核心基质。

8、根据权利要求7所述的检测试剂盒,其特征在于,所述CCP的分枝抗原肽结构是具有 $2^{\sim}8$ 个CCP分枝结构。

9、根据权利要求8所述的检测试剂盒,其特征在于,所述CCP的分枝抗原肽结构是具有4个CCP分枝结构。

10、一种权利要求1所述的诊断早期类风湿性关节炎的检测试剂盒的制备方法,具体步骤包括:

(1)包被抗原;

(2)制备对照物:包括标准品的制备,弱阳性对照品的制备,阴性对照品的制备;

(3)配制液体试剂:包括浓缩洗涤液的配制,样本稀释缓冲液的配制,酶标记的抗人IgG抗体的制备,HRP标记的抗人IgG抗体底物A液的配制,HRP标记的抗人IgG抗体底物B液的配制,HRP标记的抗人IgG抗体底物的反应终止液的配制。

11、根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,标准品有4~12个。

12、根据权利要求11所述的制备方法,其特征在于,标准品数量有5~8个。

13、根据权利要求12所述的制备方法,其特征在于,标准品数量有5个。

14、权利要求1所述的诊断早期类风湿性关节炎的检测试剂盒的完成质量检测标准的方法,其特征在于,所述质量检测标准包括成品逐批检定标准和成品周期检定标准。

15、根据权利要求14所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述成品逐批检定标准包括完整性检查、物理检查、精密性测定、准确性检定和稳定性检定。

16、根据权利要求15所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述完整性检查是试剂盒盒签和瓶签上的名称、批号、生产日期、保存方法和保质期应准确无误的检测，试剂的品种和数量齐全、说明书无缺、外盒清洁平整、包装塑封应密封良好的检测。

17、根据权利要求15所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述物理检查是试剂盒的液体应澄清，无异常色泽、不应含有异物的外观检查。

18、根据权利要求15所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述物理检查是试剂盒中各试剂的装量应不小于说明书规定的标示量95%的装量检查。

19、根据权利要求15所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述精密性测定是选择4份不同抗CCP抗体浓度的质控血清进行10孔平行测定，要求其变异系数(CV) $\leq 10\%$ 的测定。

20、根据权利要求15所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述准确性检定是用质控血清（10份RA病人和10份正常人血清）测定每批新生产的试剂盒，测定值和理论值的相对误差不大于10%。

21、根据权利要求14所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述成品周期检定标准是包括除上述逐批检验的所有项目外，另加特异度、敏感度和批间精密度的测定。

22、根据权利要求21所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述特异度的测定是收集200份正常人血清，作为特异性测定样本，特异度需大于95%的测定。

23、根据权利要求21所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述敏感度的测定是收集200份类风湿关节炎患者血清，作为敏感度测定样本，敏感度需大于80%的测定。

24、根据权利要求21所述的完成质量检测标准的方法，其特征在于，所述批间精密度的测定是取每个批号的试剂盒，每批重复3次，分别计算四份室内质控血清测定结果的总均值($\bar{x}$)和每个批号试剂盒测定结果的均值，计算每个批号试剂测定均值的相对极差(%), 合格标准为相对极差(%) $\leq 15\%$ 的测定。

诊断 RA 的检测试剂盒、制备及完成质量检测标准的方法

技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体地说涉及一种用于自身免疫病的诊断试剂盒及其制备方法和完成质量检测标准的方法，更具体地说涉及一种用于类风湿性关节炎的诊断试剂盒及其制备及完成质量检测标准的方法。

背景技术

(一) 风湿性疾病

人体免疫系统有分辨“自己”和“非己”的功能，它对自己的组织和细胞不会产生免疫反应。但是，人体免疫系统出现异常时，也可能对自己的组织和细胞产生了免疫反应，从而破坏或损伤了自己的组织或细胞，即自身免疫病，其重要标志之一是形成了抗自身组织成分的自身抗体，该自身抗体的检查是自身免疫病的重要诊断手段。

自身免疫病产生的原因非常复杂，主要是人体免疫识别功能和自身稳定功能发生紊乱；或是自身的组织和细胞因感染而发生结构或组分的改变，使免疫系统误认为“非己”而加以攻击；或是原来隐蔽的或被包围的组织或细胞(如眼球内容物，男性睾丸中的精子等)显现，被免疫系统认为是“非己”；也可能是上述情况同时存在。总之，发生自身免疫的原因仍是医学研究的难点和热点。

自身免疫病的典型疾病是系统性红斑狼疮(简称 SLE)，其他疾病有类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, 简称 RA)、皮炎、多发性肌炎、系统(多发)性硬化、硬皮病(简称 PSS)、CREST 综合征等；这些疾病曾名为“结缔组织病”，后来国际和国内均将它们归为风湿性疾病。这些风湿性疾病患者的体内都存在自身抗体，其中的“标志性抗体”可用于诊断，对于风湿性疾病的诊断及预后判断意义重大；其检查方法几经改进，诊断价值越来越大，因此生物制剂在风湿性疾病中的应用有着良好的发展前景。

风湿性疾病学是一门年轻的、多学科交叉的边缘学科，近年来发展非常迅速。探讨风湿性疾病复杂的发病机制、寻找早期诊断方法、确定疗效肯定而副作用小的治疗方法一直是整个风湿性疾病学界的奋斗目标。

(二) 类风湿性关节炎

RA 是一种最常见的以慢性多关节炎症为主要表现的系统性自身免疫性疾病，病程长，易反复，给患者造成很大痛苦；该病在我国的发病率约为 0.36%。患者发病年龄多在 20~50 岁，

女性多于男性，男女之比为 1: 3；其突出的早期临床表现为对称性多关节红肿热痛，常见四肢小关节，指间近端关节肿胀，掌指(跖趾)、腕、肘、踝甚至颞颌等关节肿痛及活动困难，晨间关节僵硬，午后逐渐减轻，关节外症状约有 20%患者可出现皮下结节；长久不愈的晚期症状，则有不同程度的关节畸形和强直，关节功能丧失等，可损伤脏器、多组织器官，造成股骨头缺血性坏死，对人体消耗大，致残率高。

由于病因至今不十分清楚，而且早期临床表现不典型，加之缺乏特异性的诊断方法，给疾病早期诊断及治疗带来一定困难。现已证明 RA 患者关节病变在发病后第一年发展最快，发病第二年即可出现不可逆的骨关节破坏，早期使用改变病情的药物可控制疾病的进展。因此，RA 的治疗关键在于早期治疗，而早期治疗的前提是早期诊断，所以早期诊断就成为大家所关注的热点问题。

目前，国内外沿用美国风湿病学会(简称 ARA)1987 年 RA 分类标准对 RA 进行诊断。此标准主要依赖于临床表现、骨关节 X 线改变和常规的血清学检测即测定类风湿因子(简称 RF)是否阳性。但是，RA 早期临床表现常常不特异或不典型，骨关节 X 线的改变只有在关节软骨破坏到一定程度才出现，加之 RF 是针对免疫球蛋白 IgG 稳定区的抗体，在 RA 早期可能不出现，其敏感性虽高(60~80%)，但缺乏特异性(62%)，即 RF 在其他自身免疫疾病和传染病中的阳性率也较高，且也可见于部分健康人群，尤其是老年人，所以说此标准不适于早期 RA 的诊断。

关于早期 RA 的定义一直是风湿性疾病学界争论的问题，2003 年 EULAR 会议提出了非常早期 RA 和早期 RA 的定义，将病程少于 12 周的 RA 定义为非常早期 RA，病程在 12 周和 2 年之间的 RA 定义为早期 RA，并强调无论非常早期还是早期 RA 均需一经诊断即给予缓解病情的抗风湿药(DMARD)治疗。

近年来，国际上许多风湿性疾病学家致力于 RA 早期诊断的研究，包括建立早期关节炎门诊、重视早期临床表现，提出早期 RA 的大体诊断标准、建立 RA 早期诊断的自身抗体检测方法，及将 CT、MRI 和 B 超等敏感的影像学检查手段应用于 RA 的早期诊断等，这是指导早期开始有效治疗 RA、改善预后的重要环节。

与 RA 有关的自身抗体包括抗角质蛋白抗体(简称 AKA)、抗核周因子(简称 APF)、抗聚角蛋白微丝蛋白抗体(简称 AFA)等。现已证明，AKA 对早期 RA 诊断的特异性为 90%、敏感性为 32%，APF 对早期 RA 诊断的特异性为 91.4%，敏感性为 35.2%；AKA 和 APF 在大约 50%的 RA 病人中有表达，但由于其抗原的特殊性(人颊黏膜上皮细胞和大鼠食道中段角质层)，以及间接免疫荧光试验(IIF)的检测方法不易标准化，使检测常规化和普及有一定难度。后发现 AKA 与 APF 的真正靶抗原是聚角蛋白微丝蛋白(cytokeratin filament aggregating protein, 简称 filaggrin)，由此制备 AFA，并证明 AFA 对 RA 诊断的特异性为 93.4%、敏感性为 36.3%。

AFA、AKA 及 APF 三者的靶抗原虽然都是 filaggrin, 但 filaggrin 是从人类表皮细胞提取的, 既不适合在免疫印迹法中作抗原底物, 也不适合在 ELISA 法中作抗原底物, 因为 filaggrin 在氨基酸的序列及形态方面存在着异质性, 使它不可能成为非常标准的抗原底物。

近年来的研究发现认为上述抗原在化学结构上具有相关性, 它们的表位都含有瓜氨酸。瓜氨酸存在于一部分人类蛋白中, 包括聚角蛋白微丝蛋白(filaggrin)。精氨酸在多肽精氨酸脱氢酶作用下, 使精氨酸残基脱氨变成瓜氨酸。有学者发现瓜氨酸是 RA 血清抗 filaggrin 相关抗体识别的主要抗原决定簇, 此结论随后被另外的学者所证实。1998 年, 国外学者利用合成的瓜氨酸肽(一种直链线性肽), 在 RA 血清中用 ELISA 方法检测出抗瓜氨酸肽抗体, 结果显示该抗体可在 76% 的 RA 中检测出, 特异性为 96%, 并且该抗体可在 RA 早期出现, 甚至在临床症状出现之前就可以检测到此抗体。以瓜氨酸肽作抗原来检测有一定的缺点: 其一, 在用 ELISA 法检测时常用到聚苯乙烯, 而瓜氨酸肽常常被聚苯乙烯吸收, 从而影响了实验结果。解决此问题的一个方法便是用共价键来连接使肽链变得更加稳定。其二, 由于瓜氨酸肽是一种直链线性肽, 且相对较短, 它在溶液中没有很稳定的构象, 这样仅有一小部分肽保持了很稳定的构象。尽管这种肽包含了所有的抗原位点, 但由于这种原因, 使得抗体对肽的亲合力降低。解决的方法是对这些肽做一些限制, 使其具有易与抗体结合的构象。在抗原—肽复合体中, 肽链经常采用 β —转角构象, 而环化肽可以模仿最初抗原决定簇的 β —转角结构, 以提高其对抗体的亲合力, 故利用这一策略, 2000 年, Schellekens 等人工合成了一种环化肽, 即环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP), 他们将一条由 19 个氨基酸残基组成的瓜氨酸肽中的两个丝氨酸替换为半胱氨酸, 形成与 β —转角具有相似结构的二硫键, 合成了 CCP, 并检测了抗 CCP 抗体。文中对环肽与直链肽的检测结果做了比较, 结果显示, 采用 CCP 为抗原用 ELISA 法检测 RA 的抗 CCP 抗体, 敏感性较用直链线性瓜氨酸肽为抗原有明显提高, 分别为 68% 和 49%, 二者的特异性相似。

随后国内外出现相关报道, 例如抗 CCP 抗体在早期 RA 时即可出现, 能够在病人临床症状出现前数年就检出 RA, 抗 CCP 抗体将成为诊断 RA 的标记抗体, 从而有助于预防关节损伤的出现。荷兰 Leiden 大学的 Floris A. van Gaalen 等 2003 年在美国风湿病学会第 67 届年会上报告, 在新近诊断为关节炎的 936 名患者中, 有 34%、计 318 例属于分类不明的关节炎患者, 其中的 69 例(21%)当时为抗 CCP 抗体阳性; 经过三年随访之后, 在这 318 名患者中有 127 例(40%)被诊断为 RA; 当初 69 例抗 CCP 抗体阳性者中有 64 例(93%)被确诊为 RA, 而 249 例阴性者中仅有 63 例(25%)被确诊为 RA。van Gaalen 认为, 抗 CCP 抗体阳性的 RA 患者病情要比阴性者严重, 更容易发展成可通过放射性方法检测到的关节损害, 早期发现并及时给予治疗十分重要。北京协和医院在国内率先建立了检测抗 CCP 抗体的 ELISA 方法, 为 RA 的早期

诊断提供了一种新的定性手段；北京协和医院曾小峰等的资料显示，294 例 RA 病人中，抗 CCP 抗体对 RA 诊断的特异性和敏感性分别为 96.6%和 46.6%。

美国关节炎基金会主席和 CEO Klippel 认为，抗 CCP 抗体对 RA 的意义，与前列腺特异性抗原 (PSA) 对筛查前列腺癌的意义相当，该基金会 2003 年首次对关节炎研究领域的年度重大进展进行总结，RA 新标志物抗 CCP 抗体就被评为关节炎研究十大进展之一。欧洲等风湿病学界也肯定了抗 CCP 抗体在 RA 早期诊断中的价值，研究结果显示预测 RA 的独立参数是抗 CCP 抗体、关节肿胀数、握力和 AKA 阳性，最好的预测指标为抗 CCP 抗体，有助于在临床症状出现前数年准确检出 RA，并已将此抗体列入常规检测。

综上所述，由于抗 CCP 抗体出现于 RA 的早期，并与严重的骨关节破坏等病变相关，因此对于 RA 的诊断有很高的临床价值，是诊断 RA 的一种高特异度新指标。

发明内容

本发明的目的之一在于提供一种能够快速早期诊断 RA 的检测试剂盒，目的之二在于提供该试剂盒的制备方法，目的之三在于提供该试剂盒的完成质量检测标准的方法。

本发明的上述目的是通过如下技术方案实现的：

本发明公开了一种诊断早期类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的检测试剂盒，所述试剂盒是检测抗环瓜氨酸肽 (cyclic citrullinated peptide, CCP) 抗体的检测试剂盒。

本发明还公开了上述诊断早期类风湿性关节炎的检测试剂盒的制备方法，具体步骤如下：

(1) 包被抗原；

(2) 制备对照物：包括标准品的制备，弱阳性对照品的制备，阴性对照品的制备；

(3) 配制液体试剂：包括浓缩洗涤液的配制，样本稀释缓冲液的配制，酶标记的抗人 IgG 抗体的制备，HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 A 液的配制，HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 B 液的配制，HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物的反应终止液的配制。

本发明还提供了上述诊断早期类风湿性关节炎的检测试剂盒的完成质量检测标准的方法，所述质量检测标准包括成品逐批检定标准和成品周期检定标准。

本发明的技术构思如下：

1. 本发明最主要的目的是提供一种新型的、高特异度和敏感度的能够快速早期诊断 RA 的检测试剂盒。本发明所采用的用于 RA 早期诊断的指标是抗 CCP 抗体，CCP 是 RA 诊断特异因子抗核周因子、抗角蛋白抗体、抗聚角蛋白微丝蛋白抗体的共同抗原决定簇。单一的 CCP 分子量较小且表位单一，虽然它对 RA 诊断有很高的特异度，但敏感度较低。为了提高抗 CCP 抗体诊断 RA 的敏感度。本试剂盒中的包被抗原采用了 CCP 的分枝抗原肽 (MAP) 结构。MAP 是以多聚赖氨酸 (poly-Lys, PL) 为核心基质，它能在确切的部位结合多条多肽链。这种 MAP 结构为树枝结构，

增大了分子量且能很好地模拟天然表位构象,从而提高了其对RA诊断的敏感度。

2. 本发明以CCP的MAP结构为包被抗原, 自行建立检测方法, 用于快速检测RA病人中的抗CCP抗体。本发明采用经典的ELISA, 选择使用合适的对照物后, 能够对抗CCP抗体进行定性或定量检测。由于抗CCP抗体国际上目前尚无统一的标准品, 亦无统一的浓度评价单位。为了实现定量检测, 本发明中抗CCP抗体的浓度评价单位采用相对单位(RU/ml), 按照本发明所述的方法, 生产企业通过内部校正就能够得到有关的质量检测标准。

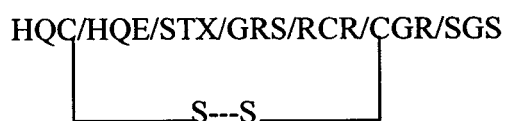
3、本发明采用ELISA间接测定抗CCP抗体的基本原理如下：包被在酶标板上的抗原为CCP的分枝抗原肽（MAP）结构，将稀释后的待检血清和对照物加入反应板孔中，如果被检血清中存在抗CCP抗原成分的抗体，经温育后，则血清中的特异性抗体与反应板孔中的固相CCP抗原结合，形成固相抗原抗体复合物；洗去未结合的抗体成分，加入酶标记的抗人IgG抗体温育，与固相CCP抗原结合的抗CCP抗体再与酶标记抗人IgG抗体结合；洗去未结合的酶标抗体成分，加入底物。底物被酶催化成为有色产物，最后加入终止液终止反应。根据盒体内的对照物，可对抗CCP抗体进行定性或定量检测。

本发明对以上的构思进行了逐一验证，研究结果均证明本构思的正确性。

抗 CCP 抗体诊断试剂盒的组成

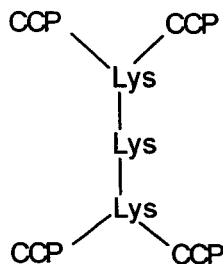
本发明的诊断试剂盒包括盒体，设在盒体内的酶标板、对照物和液体试剂；在酶标板的每个孔内有包被液包被、且被无关蛋白或血清封闭的特异性抗原 CCP 的分枝抗原肽（MAP）结构。

所述的特异性抗原 CCP 的氨基酸序列为:



其中“S---S”表示二硫键，X表示瓜氨酸，其他字母分别为常见氨基酸的单字母记号，即H表示组氨酸(histidine)、Q表示谷氨酰胺(glutamic)、C表示半胱氨酸(cysteine)、E表示谷氨酸(glutamic acid)、S表示丝氨酸(serine)、T表示苏氨酸(threonine)、G表示甘氨酸(glycine)、R表示精氨酸(arginine)。

CCP 的分枝抗原肽 (MAP) 结构是以多聚赖氨酸 (poly-Lys, PL) 为核心基质, 一般采取 2~8 个分枝, 优选 4 个分枝。以四个分枝为例, 其结构大致如下:



以上人工合成的 MAP 结构，纯度要求 HPLC 方法大于 95%。

所述的无关蛋白或血清包括牛血清白蛋白、酪蛋白、脱脂奶粉、饱和赖氨酸和小牛血清等。

所述的酶标板包括 96 孔酶标板或 48 孔酶标板等。

所述的对照物包括抗 CCP 抗体的标准品 (简称标准品)、弱阳性对照品和阴性对照品。

所述的标准品是抗 CCP 抗体阳性、并确诊为 RA 的病人血清，盒体内设多个标准品，优选 5 个标准品。根据其波长 450nm 的吸光度 (简称 OD₄₅₀) 的数值确定相应的浓度数值，绘制标准品的剂量反应曲线。根据该曲线，能够确定待检标本中抗 CCP 抗体的浓度，实现定量检测。这种定量检测方法，能够动态观察病人血清中抗 CCP 抗体浓度的变化，有利于监测病人的病情变化。

所述的弱阳性对照品是抗 CCP 抗体阳性、并确诊为 RA 的病人血清，但其抗 CCP 抗体是弱阳性，确定的方法是血清的抗 CCP 抗体的浓度必须在临界值 (简称 CUTOFF) 附近。通过比较待检标本和弱阳性对照品的吸光度值，就能够定性确定待检标本的阴阳性，即实现了定性检测。

所述的阴性对照品是为多份正常人血清的混合品，一般选择 3~15 份正常人血清的混合品，优选 8~10 份正常人血清的混合品，进一步优选 10 份正常人血清的等比例混合品。

所述的液体试剂包括浓缩洗涤液、样品稀释液、酶标记的抗人 IgG 抗体、酶的底物和反应终止液等。

所述的浓缩洗涤液是经浓缩的洗涤液，一般是 30 毫升 (简称 ml)~100ml/瓶，浓缩的倍数一般是 5~20 倍；以 10 倍浓缩的洗涤液为例 (简称 10×PBST)，其配比如下：

氯化物：	150 克 (简称 g)~300g
磷酸盐	18g~38g
去污剂：	5ml~20ml
纯化水：	2.5 升 (简称 L)

分装成 30ml~100ml/瓶。

注：上述的氯化物指氯化钠，氯化钾等。磷酸盐指磷酸钾盐或磷酸钠盐，去污剂指吐温-20 或 Triton X-100 等。

所述的样本稀释缓冲液，一般是 30ml~100ml/瓶，其配比如下：

无关蛋白或血清:	10g~30g
防腐剂:	10ml~30ml
抗生素:	4ml~10ml
洗涤液(1×PBST):	2.5L

分装成 30ml~100ml/瓶。

注: 无关蛋白或血清指牛血清白蛋白、酪蛋白、脱脂奶粉、饱和赖氨酸和小牛血清等。

所述的酶标记的抗人 IgG 抗体包括碱性磷酸酶(简称 AP)或辣根过氧化物酶(简称 HRP)标记的羊、兔等抗人 IgG 抗体, 一般是 15ml~25ml/瓶, 以 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体为例, 采购商用的 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体, 按照 1:30000~1:40000 的比例用抗体稀释液进行稀释, 稀释后分装成 15ml~25ml/瓶, 再直接使用。抗体稀释液是从有关公司购买的商用产品。

所述的酶的底物以 HRP 标记的抗人 IgG 抗体的底物为例:

底物 A, 一般是 10ml~20ml/瓶, 配比如下:

柠檬酸-磷酸盐:	12g~33g
受氢体:	200 μ l~500 μ l
纯化水:	500ml

分装成 10ml~20ml/瓶。

注: 最具代表性的受氢体为过氧化氢或过氧化氢尿素。

底物 B, 一般是 10~20ml/瓶, 配比如下:

供氢体:	0.05g~0.15g
有机溶剂:	1.5ml~3ml
纯化水:	500ml

分装成 10ml~20ml/瓶。

注: 常用的供氢体有邻苯二氨(OPD)、四甲基联苯氨(TMB)和 ABTS 等。有机溶剂一般包括二甲基亚砷(DMSO)和无水乙醇。

所述的反应终止液以 HRP 标记的抗人 IgG 抗体的底物的终止液为例, 一般是 10~20ml/瓶, 配比如下:

浓硫酸(H ₂ SO ₄):	40ml~60ml
纯化水:	460ml~440ml

分装成 10ml~20ml/瓶。

抗 CCP 抗体诊断试剂盒的制备方法

本发明抗 CCP 抗体诊断试剂盒是采用以下方法进行制备的, 主要包括三个部分:

(1) 包被抗原:

①包被液的配制: 取碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠(NaHCO_3), 溶解水中, 灭菌, 低温保存。

②封闭液的配制: 取 BSA, 溶解 $1\times\text{PBST}$ 中, 过滤, 低温保存。

③操作方法: 用包被液稀释抗原 CCP, 将该液体加入酶标板的各孔中, 低温放置后, 取出酶标板, 去除包被液, 洗板, 干燥; 加入封闭液, 放置后, 取出酶标板, 弃去封闭液, 洗板, 干燥; 干燥酶标板, 真空箱内保存待用; 生产时, 将酶标板条装入袋中, 真空封口。

(2) 制备对照物:

①标准品的制备:

采用相对单位(RU/ml)为浓度单位, 使用标准品绘制标准曲线; 为绘制标准曲线, 需设多个测量点, 根据测量点的数量, 制备相应数量的标准品, 一般设4~12个测量点, 优选5~8个测量点, 进一步优选5个测量点。

浓度单位的设定方法是: 按照 OD_{450} 的上限和下限分别确定浓度单位的上限和下限, 中间部分将 OD_{450} 的数值按照等比、等差或比例等方法常规方法设定相应的浓度单位; 浓度单位的上限一般设定为100RU/ml或1000RU/ml, 浓度单位的下限一般设定为0RU/ml, 浓度单位的中间部分一般有3~10个浓度设定点, 优选5~8个浓度设定点, 进一步优选3个浓度设定点。

取抗 CCP 抗体阳性的 RA 病人血清, 用抗体稀释液进行稀释、混匀, 得混合液 X; 取其部分分装, 注明为标准品-X, 低温贮存;

取上述余下的混合液 X, 加入抗体稀释液、混匀, 得混合液 X-1; 再取其部分分装, 注明为标准品-X-1 号, 低温贮存;

取上述余下的混合液 X-1, 加入抗体稀释液、混匀, 得混合液 X-2; 再取其部分分装, 注明为标准品-X-2 号, 低温贮存;

重复以上操作, 从而逐步得到需要的多份标准品, 待用。

②弱阳性对照品的制备: 取多份抗 CCP 抗体弱阳性的 RA 病人血清, 混合后离心取上清, 过滤除菌, 将上清加入到抗体稀释液中, 混合, 分装, 低温保存待用。

③阴性对照品的制备: 取多份正常人血清, 等比例混合后离心取上清, 过滤除菌, 将上清加入到抗体稀释液中, 混合, 分装, 低温保存待用。

(3) 配制液体试剂:

①浓缩洗涤液的配制: 取适量的 NaCl 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 溶解于水中。用 NaOH 调节 PH 值, 再加入吐温-20, 再加水混合至定量, 灭菌, 低温保存。

②样本稀释缓冲液的配制: 将浓缩洗涤液稀释, 称取 BSA 溶解其中, 加入硫柳汞钠盐、

庆大霉素，再加水混合至定量，过滤，低温保存。

③酶标记的抗人 IgG 抗体的制备：取酶标记的抗人 IgG 抗体酶标结合物贮存液，加抗体稀释液稀释，混匀，低温贮存。

④HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 A 液的配制：取柠檬酸和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，溶解水中，加入过氧化氢，混合，加水稀释，低温保存。

⑤HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 B 液的配制：取 TMB 溶解水中，加入 DMSO，在搅拌的同时，缓慢加入 HCL，至完全溶解，最后加水稀释，低温保存。

⑥HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物的反应终止液的配制：取浓硫酸，缓慢加入到水中，混匀，低温保存。

抗 CCP 抗体诊断试剂盒的完成质量检测标准的方法

本发明抗 CCP 抗体诊断试剂盒的质量检测标准是产品出厂前最后的把关检测标准，成品检定标准分为逐批检定标准和周期检定标准。

逐批检定标准包括精密性检定、准确性检定、稳定性检定等，而完整性检查、物理检查等属于一般产品的常规检测规定。

(1) 精密性测定：选择多份不同浓度的质控血清进行平行测定，其变异系数(CV) $\leq 10\%$ 。

(2) 准确性检定：用本公司的质控血清测定每批新生产的试剂盒，测定值和理论值的相对误差不大于10%。

(3) 稳定性检定：试剂盒放在37℃四天后，物理检查、精密性测定和准确性测定都符合以上规定。

周期检定标准包括除上述逐批检验的所有项目外，另加以下项目：特异度、敏感度和批间精密度测定。

(1) 特异度的测定：从医院多份收集正常人血清，作为特异性测定样本，特异度需大于95%。

特异度=阴性样本数目/检测样本总数目

(2) 敏感度的测定：从医院收集多份类风湿关节炎患者血清，作为敏感度测定样本，敏感度需大于80%。

敏感度=阳性样本数目/检测样本总数目

注：类风湿关节炎(RA)患者符合1987年美国风湿病协会修订的RA分类诊断标准。

(3) 批间精密度的测定

选择每批生产的留样为测定样本。

取每个批号的试剂盒,每批重复3次,分别计算多份室内质控血清测定结果的总均值($\bar{x}_T$)和每个批号试剂盒测定结果的均值($\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$)。按下公式求出每个批号试剂测定均值的相对极差(%)。

$$\text{批间极差} = (\bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min}) / \bar{x}_T \times 100$$

式中: $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 为测定的同批号所测每份室内质控血清的均值;

$\bar{x}_{\max}$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 中的最大值;

$\bar{x}_{\min}$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 中的最小值。

合格标准: 相对极差(%) $\leq 15\%$ 。

本发明所采用的用于RA早期诊断的指标是抗CCP抗体,它是一个高特异性新指标,在RA早期阶段就可出现阳性,具有很高的阳性预测值。

本发明的试剂盒中包被的CCP抗原采用MAP结构,它较单一的CCP可提高其对RA诊断的敏感度。

本发明采用经典的酶联免疫吸附分析法(ELISA),该方法的优点是操作简便,敏感度高,且能用于大批样品的快速检测。

本发明的试剂盒中设有弱阳性对照品和标准曲线,可同时对抗CCP抗体进行定性和定量检测,满足不同需要。

附图说明

图1是本发明实施例4的一典型标准曲线的示例图。

具体实施方式

本发明公开一种新型的、高特异度和敏感度的能够快速早期诊断RA的检测试剂盒及其制备方法和完成质量检测标准的方法,以满足人们疾病治疗、科学研究、药物开发等方面的需要。

下面以使用5份标准品为例,详细阐述制备抗CCP抗体诊断试剂盒的具体操作方法。

本发明抗CCP抗体诊断试剂盒是采取以下方法进行制备的,主要包括三个部分:

(1)包被抗原

①包被稀释液的配制:用800ml纯化水溶解碳酸钠(Na_2CO_3)1~2g、碳酸氢钠(NaHCO_3)2~4g,充分溶解后,加水定容至1000ml。分装400~500ml/瓶,在15psi(1.05kg/cm²)高压蒸汽灭菌20分钟,2~8℃下保存。

②封闭液的配制:称取5g~15g的BSA,完全溶解于1000ml的1×PBST中。然后用0.22

μm 滤膜抽滤，分装 400ml~500ml/瓶，2~8℃下保存。

③操作方法：用包被液稀释抗原CCP至5~10 $\mu\text{g/ml}$ ，然后将加有抗原的包被液加入酶标板的各孔中，每孔100 μl ；2~8℃放置16~18h，之后取出酶标板，甩去包被液，洗板三次，拍干，加入封闭液，每孔200 μl ；37℃放置1.5h~3h，之后取出酶标板，弃去封闭液，洗板三次，拍干；将酶标板板条放置在真空干燥箱内进行真空抽干并于真空箱内保存1~5h；最后将酶标板条装入铝箔袋，真空封口机封口。

(2)制备对照物

①标准品的制备：本试剂盒的5个标准品采用的浓度单位是相对单位(RU/ml)，其设定方法如下：

OD₄₅₀=1.8~2.0时，设定浓度单位为100RU/ml，作为上限；

OD₄₅₀=0.9~1.0时，设定浓度单位为50RU/ml；

OD₄₅₀=0.4~0.5时，设定浓度单位为25RU/ml；

OD₄₅₀=0.2~0.3时，设定浓度单位为12RU/ml；

OD₄₅₀=0.1~0.15时，设定浓度单位为6RU/ml；

OD₄₅₀=0.06~0.08时，设定浓度单位为3RU/ml；

OD₄₅₀=0.01~0.06时，设定浓度单位为0RU/ml，作为下限；

绘制标准曲线，设5个测量点，分别制备标准品1~5号(0、6、25、50、100RU/ml)。

5号标准品的制备：取抗CCP抗体阳性且OD₄₅₀=1.8~2.0的RA病人血清1~1.2ml，用100ml~120ml样品稀释液进行稀释，充分混匀；取其中的50ml~60ml，分装标准小瓶，每瓶1ml~1.5ml，注明为标准品-5号，2~8℃下贮存。

4号标准品的制备：取上述余下的50ml~60ml，加入样品稀释液至50ml~60ml，充分混匀；再取其中的50ml~60ml分装标准小瓶，每瓶1ml~1.5ml，注明为标准品-4号，2~8℃下贮存。

3号标准品的制备：取上述余下的50ml~60ml，加入样品稀释液至50ml~60ml，充分混匀；再取其中的50ml~60ml分装标准小瓶，每瓶1ml~1.5ml，注明为标准品-3号，2~8℃下贮存。

2号标准品的制备：取上述余下的50ml~60ml，加入样品稀释液至50ml~60ml，充分混匀；取其中的50ml~60ml溶液，分装标准小瓶，每瓶1ml~1.5ml，注明为标准品-2号，2~8℃下贮存。

1号标准品的制备：取样品稀释液，分装标准小瓶，每瓶1ml~1.5ml，注明为标准品-1号，2~8℃下贮存。

②弱阳性对照品的制备：取一份抗CCP抗体阳性的RA病人血清500 μl ~700 μl ，离心取上清，用0.22 μm 生物滤膜过滤除菌。最后将上清加入到50ml~70ml抗体稀释液中，充分混合，分装成1ml~1.5ml/瓶，2~8℃下保存。

③阴性对照品的制备：取3~15份正常人血清，每份血清取50 μl ~70 μl ，等比例充分混合后离心，上清用0.22 μm 生物滤膜过滤除菌，最后将上清加入到50ml~70ml抗体稀释液中，充

分混合，分装成1ml~1.5ml/瓶，2~8℃下保存。

(3)配制液体试剂

①浓缩洗涤液的配制(以10倍浓缩的洗涤液为例)：称取150g~300g的NaCl、15g~30g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和3g~8g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，溶解于2.2L纯化水中。用NaOH调节PH值为7.4，再加入5ml~20ml的吐温-20，最后加水至2.5L。分装成40~100ml/瓶，在15psi(1.05kg/cm²)高压蒸汽灭菌20分钟，2~8℃下保存。

②样本稀释缓冲液的配制：将10×PBST稀释成1×PBST，稀释后的体积为2.5L。称取10g~30g的BSA溶解于2L的1×PBST中，加入10ml~30ml的1%硫柳汞钠盐，4ml~10ml的庆大霉素(40mg/ml)，最后加1×PBST至2.5L。混匀后，0.22μm滤膜抽滤，分装成40~100ml/瓶，保存于2~8℃。

③酶标记的抗人IgG抗体的制备：以HRP标记的羊抗人IgG抗体为例，取19μl~25μl的HRP标记的抗人IgG抗体酶标结合物贮存液，加750ml抗体稀释液作30000~40000倍稀释，混匀，分装成15~25ml/瓶，2~8℃贮存。

④底物的配制：以HRP标记的羊抗人IgG抗体的底物为例，底物A液的配制：称取10g~25g的柠檬酸和2g~8g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解于400ml纯化水中，然后缓慢加入200μl~500μl的30%过氧化氢，搅拌均匀后，加水至500ml。分装成10~20ml/瓶，2~8℃下保存。底物B液的配制：称取0.05g~0.15g的TMB于100ml纯化水中，加入1.5ml~3ml的DMSO，在搅拌的同时，缓慢加入0.2ml~1ml的6N的HCL，直至完全溶解，最后加水至500ml。分装成10~20ml/棕色小瓶，2~8℃下保存。

⑤反应终止液的配制：以HRP标记的羊抗人IgG抗体的底物的反应终止液为例，分别量取98%浓硫酸40~60ml和纯化水460~440ml，然后把浓硫酸缓慢加入到纯化水中，充分混匀。分装成10~20ml/瓶，2~8℃下保存。

下面详细阐述抗CCP抗体诊断试剂盒质量检测标准的具体内容和操作方法。

本发明抗CCP抗体诊断试剂盒的质量检测标准，是产品出厂前最后的把关检测标准，即成品检定标准，分为逐批检定标准和周期检定标准。

逐批检定标准包括完整性检查、物理检查、精密性测定、准确性检定和稳定性检定等。

①完整性检查：

试剂盒盒签和瓶签上的名称，批号，生产日期，保存方法和保质期应准确无误。试剂的品种和数量齐全，说明书无缺，外盒清洁平整，包装塑封应密封良好。

②物理检查：

外观检查：试剂盒的液体应澄清，无异常色泽、不应含有异物；

装量检查：试剂盒中各试剂的装量应不小于说明书规定的标示量的95%。

③精密性测定：

选择4份不同抗CCP抗体浓度的质控血清进行10孔平行测定，其变异系数(CV)≤10%。

④准确性检定：

用本公司的质控血清（10份RA病人和10份正常人血清）测定每批新生产的试剂盒，测定值和理论值的相对误差不大于10%。

⑤稳定性检定：

试剂盒放在37℃四天后，物理检查、精密性测定和准确性测定都符合以上规定。

周期检定标准包括除上述逐批检验的所有项目外，另加以下项目：特异度、敏感度和批间精密度测定。

（1）特异度的测定：从医院 200 份收集正常人血清,作为特异性测定样本，特异度需大于 95%。

特异度=阴性样本数目/检测样本总数目

（2）敏感度的测定：从医院收集 200 份类风湿关节炎患者血清,作为敏感度测定样本，敏感度需大于 80%。

敏感度=阳性样本数目/检测样本总数目

注：类风湿关节炎（RA）患者符合 1987 年美国风湿病协会修订的 RA 分类诊断标准。

（3）批间精密度的测定

选择每批生产的留样为测定样本。

取每个批号的试剂盒，每批重复 3 次，分别计算四份室内质控血清测定结果的总均值($\bar{x}_T$)和每个批号试剂盒测定结果的均值($\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$)。按下公式求出每个批号试剂测定均值的相对极差 (%)。

$$\text{批间极差} = (\bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min}) / \bar{x}_T \times 100$$

式中： $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 为测定的同批号所测每份室内质控血清的均值；

$\bar{x}_{\max}$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 中的最大值；

$\bar{x}_{\min}$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 中的最小值。

合格标准：相对极差 (%) ≤ 15%。

除严格按上述规程操作，每批生产过程中的半成品也必须严格进行质检：

对新配制的酶标抗体、预包被的酶标板，分别替代原来已经检验合格的试剂盒中的相应成分，和前一生产批的试剂盒一起对质控样品进行测定，二者误差应 ≤ 5%。

用已检定合格的试剂盒对新配制的标准品、弱阳性对照品和阴性对照品进行测定，测定值和理论值的相差不大于 5%。

对新配制的其他液体试剂分别测其PH值和电导率，应符合相应标准。

以上所有的半成品经检验合格后方可分装，组装成盒。

下面通过实施例来具体说明本发明的内容，所述的实施例是为了更好地阐述本发明，并不是用来限制本发明的范围。

实施例1

对照物的制备

①标准品的制备

5号标准品的制备：取抗CCP抗体阳性且 $OD_{450}=1.8\sim 2.0$ 的RA病人血清1ml，用100ml样品稀释液进行稀释，充分混匀；取其中的50ml，分装标准小瓶，每瓶1ml，注明为标准品-5号， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下贮存。

4号标准品的制备：取上述余下的50ml，加入样品稀释液至50ml，充分混匀；再取其中的50ml分装标准小瓶，每瓶1ml，注明为标准品-4号， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下贮存。

3号标准品的制备：取上述余下的50ml，加入样品稀释液至50ml，充分混匀；再取其中的50ml分装标准小瓶，每瓶1ml，注明为标准品-3号， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下贮存。

2号标准品的制备：取上述余下的50ml，加入样品稀释液至50ml，充分混匀；取其中的50ml溶液，分装标准小瓶，每瓶1ml，注明为标准品-2号， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下贮存。

1号标准品的制备：取样品稀释液50ml，分装标准小瓶，每瓶1ml，注明为标准品-1号， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下贮存。

②弱阳性对照品的制备：取一份抗CCP抗体阳性的RA病人血清 $500\mu\text{l}$ ，离心取上清，用 $0.22\mu\text{m}$ 生物滤膜过滤除菌。最后将上清加入到50ml样品稀释液中，充分混合，分装成1ml~1.5ml/瓶， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。

③阴性对照品的制备：取10份正常人血清，每份血清取 $50\mu\text{l}$ ，等比例充分混合后离心，上清用 $0.22\mu\text{m}$ 生物滤膜过滤除菌，最后将上清加入到50ml样品稀释液中，充分混合，分装成1ml/瓶， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。

实施例2

液体试剂的配制

①浓缩洗涤液的配制：以10倍浓缩的洗涤液为例，其配比如下：

氯化钠(NaCl):	217.5g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$):	28.75g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):	5g
吐温-20(TWEEN-20):	12.5ml
纯化水:	2.5L

配制方法：称取217.5g的NaCl、28.75g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和5g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，溶解于2.2L纯化水中。用NaOH调节PH值为7.4，再加入12.5ml的吐温-20，最后加水至2.5L。

分装成 50ml/瓶，在 15psi(1.05kg/cm²)高压蒸汽灭菌 20 分钟，保存于 2℃。

②样本稀释缓冲液的配制，其配比如下：

牛血清白蛋白(简称 BSA):	25g
1%硫柳汞钠盐:	12.5ml
庆大霉素(40mg/ml):	6.25ml
1×PBST:	2482ml

配制方法：将 10×PBST 稀释成 1×PBST，稀释后的体积为 2.5L。称取 BSA 25g 溶解于 2L 1×PBST 中，加入 1%硫柳汞钠盐 12.5ml，庆大霉素(40mg/ml)6.25ml，最后加 1×PBST 至 2.5L。混匀后，0.22 μm 滤膜抽滤，分装成 50ml/瓶，保存于 2℃。

③HRP 标记的抗人 IgG 抗体配制：以 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体为例，采购 sigma 公司的 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体(货号：033K4824)，取 19 μl 贮存液，加 750ml 抗体稀释液作 40000 倍稀释，混匀，分装标准小瓶，每瓶 15ml，2~8℃贮存。抗体稀释液是从 Pierce 公司购买(货号：37552)。

④HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 A 的配制，配比如下：

柠檬酸(C ₆ H ₈ O ₇ •H ₂ O):	17.9g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O):	4.67g
30%过氧化氢(H ₂ O ₂):	330 μl
纯化水定容至	500ml
分装成 10ml 瓶。	

配制方法：称取柠檬酸 17.9g 和 Na₂HPO₄ 12H₂O 4.67g 溶解于 400ml 纯化水中，然后缓慢加入 30%过氧化氢 330 μl，搅拌均匀后，加水至 500ml。分装成 10ml/瓶，保存于 2℃

⑤HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 B 的配制，配比如下：

3,3',5,5'-四甲基联苯氨(TMB):	0.1g
二甲基亚砷(DMSO):	2.5ml
6 当量(N)盐酸(HCL):	0.5 ml
纯化水定容至	500ml
分装成 10ml 瓶。	

配制方法：称取 TMB 0.1g 于 100ml 纯化水中，加入 DMSO 2.5ml，在搅拌的同时，缓慢加入 6N HCL 0.5 ml，直至完全溶解，最后加水至 500ml。分装成 10ml 棕色小瓶，保存于 2℃。

⑥HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物反应终止液的配制,配比如下：

98%浓硫酸(H ₂ SO ₄):	55ml
纯化水:	445ml

配制方法：分别量取 98%浓硫酸 55ml 和纯化水 445ml，然后把浓硫酸缓慢加入到纯化水

中，充分混匀。分装成 10ml/瓶，保存于 2℃。

实施例3

包被抗原

包被稀释液的配制：用 800ml 纯化水溶解碳酸钠(Na_2CO_3)1.59g、碳酸氢钠(NaHCO_3)2.93g，充分溶解后，加水定容至 1000ml。分装 500ml/瓶，在 15psi(1.05kg/cm²)高压蒸汽灭菌 20 分钟，保存于 8℃。

封闭液的配制：称取 10g BSA，完全溶解于 1000ml 1×PBST 中。然后用 0.22 μm 滤膜抽滤，分装 500ml/瓶，保存于 8℃。

酶标板：购自丹麦 NUNC 公司，型号：Maxisorp，规格：可拆卸板条，96 人份/套，8 条/套，12 孔/条。

取 CCP 贮存母液(2mg/ml)1.25ml，用 499ml 包被稀释液稀释，包被抗原的浓度为 5 μg/ml。然后将加有抗原的包被液加入酶标板的各孔中，避免加样产生气泡，如出现，用吸耳球去掉，每孔 100 μl；置于 8℃ 下 17h，之后取出酶标板，甩去包被液，洗板三次，拍干，加入封闭液，每孔 200 μl；置于 37℃ 下 2h，之后取出酶标板，弃去封闭液，洗板三次，拍干；将酶标板板条放置在真空干燥箱内进行真空抽干并于真空箱内保存 1h；最后将酶标板条装入铝箔袋，真空封口机封口，贴标签和加盖批号。

实施例4

本发明试剂盒测试样本的标准操作规程

(1)准备工作：

①实验前 30 分钟将试验用试剂从冰箱中取出，待温度与室温平衡后使用。各试剂在使用前应充分混合。

②配制应用洗涤液：将试剂盒中的浓缩洗涤液(10×)按 1：10 倍稀释(即 100ml→900ml)。如果一次不需使用整块板进行测试，则根据测试样本孔数，取相应量的浓缩的洗涤液，按 1：10 倍的比例稀释。稀释后的应用洗涤液可在 6℃ 环境下保存一周。

③稀释待检血清：将待检血清用样本稀释液，按 1:101 的比例稀释(即 5μl→500μl)，应充分混匀，检测待检血清必须做复孔。稀释后的血清样本应在 8 小时内使用。根据需要加参控品或标准品。

④每一次实验都必需加阳性对照品和阴性对照品。

(2)操作步骤

①将所需 CCP 抗原包被的微孔板条放置在酶标板架上，不需要的板条应立即放回装有干燥剂的小袋中，并将其密封好，尽量减少与水蒸汽的接触。

②加样品：分别向孔中标准品、对照品和稀释后的待检血清，每孔 100μl，用封板纸把板

条封好，室温(20℃~25℃)温育半小时(加完最后一个样本后开始计时)。

③洗板：把反应孔内的溶液倾出，每孔加入 300μl 应用洗涤液，，甩干。如此重复 3 次，最后把板条倒扣拍干。

④加酶标二抗，每孔 100μl。室温温育半小时。

⑤洗板：把反应孔内的溶液倾出，每孔加入 300μl 应用洗涤液，洗涤液在孔中停留 1 分钟，甩干。如此重复 5 次，最后把板条倒扣拍干，直至吸水纸上没有水的痕迹。

⑥显色：每孔加入显色 A、B 液各 50μl，混匀，在室温避光反应 30 分钟。

⑦终止反应：每孔加入 50μl 终止液，轻轻震荡混匀，终止反应。

⑧酶标仪测定波长设定在 450nm，半小时内测定各孔 OD₄₅₀ 值。

⑨分析结果，填写记录表。

(3)结果计算与判定

①定性的形式

结果计算：比值=样本 OD₄₅₀ / 弱阳性对照品 OD₄₅₀

结果判定：

比值<0.95	阴性
0.95<比值≤1.0	临界
比值>1.0	阳性

②定量的形式

标准曲线绘制：以五个标准品的 OD₄₅₀ 值为纵坐标，各自对应的浓度为横坐标，绘制出标准曲线。

结果计算：计算样本平行测定的 OD₄₅₀ 平均值，然后在标准曲线上读出相应的浓度。

结果判定：

≥30RU/ml	阳性
<30RU/ml	阴性

图 1 为一典型标准曲线的示例。

实施例 5

本产品对 RA 诊断的敏感度和特异度的评价

从上海长征医院收集类风湿关节炎患者血清 200 份，作为敏感度测定样本。正常人血清 200 份，作为特异性测定样本。所得结果如下：

本发明的试剂盒	长征医院收集血清		合计
	RA 患者血清	非 RA 患者血清	
阳性	真阳性(162)	假阳性(8)	170
阴性	假阴性(38)	真阴性(192)	230
合计	200	200	400

敏感度=真阳性/(真阳性+假阴性)=162/200=81%。

特异度=真阴性/(真阴性+假阳性)=192/200=96%。

注：真阳性样本指 200 份类风湿关节炎患者血清样本用本试剂盒测试是阳性的样本，假阴性样本指 200 份类风湿关节炎患者血清样本用本试剂盒测试是阴性的样本。真阴性样本指 200 份正常人血清样本用本产品测试是阴性的样本，假阳性样本指 200 份正常人血清样本用本产品测试是阳性的样本。

实施例 6

本产品批间和批内精密度的测定

(1)批内精密度

选择四份不同浓度的室内质控样品作为测定样本。每个测定样本在同一批试剂盒重复测定 20 次。测定完成后，分别计算测定结果均值($\bar{x}$)、标准差(SD)。按(1)式求出每个测定样本的变异系数(CV%)。

$$CV\% = SD / \bar{x} \cdots \cdots (1)$$

式中：SD 为测定样本的标准差；

$\bar{x}$ 为测定样本的均值；

CV%为测定样本的变异系数。

结果如下：

血清	重复次数(n)	浓度(RU/ML)	CV
1	20	78.5	2.6%
2	20	27.5	6.3%
3	20	3.5	8.3%
4	20	2.5	6.5%

(2)批间精密度

选择四份不同浓度的室内质控样品作为测定样本。取 3 个批号的试剂盒，每批 3 盒，测定完成后，分别计算每一份血清 9 个试剂盒测定结果的总均值($\bar{x}_T$)和每个批号 3 盒试剂盒测

定结果的均值($\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$)。

批间极差= $(\bar{x}_{\max}-\bar{x}_{\min})/\bar{x}_T \times 100 \dots\dots\dots(2)$

式中： $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 为测定的同批号浓度值的均值；

$\bar{x}_T$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 的均值；

$\bar{x}_{\max}$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 中的最大值；

$\bar{x}_{\min}$ 为 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 、 $\bar{x}_3$ 中的最小值。

结果如下：

血清	批数	浓度(RU/ML)	相对极差
1	3	77.4	4.7%
2	3	27.2	6.5%
3	3	3.6	8.9%
4	3	2.3	7.3%

实施例7

原材料的质量控制标准示例

为了进一步保证生产的试剂盒能长时间稳定，提高成品率，还要在原材料的来源及其质控标准上进行把关：

①包被抗原CCP：人工合成CCP的MAP结构，纯度要求HPLC方法大于95%。加10mM的PH为7.4的PB应在1分钟内迅速完全溶解。

②酶联测定板：购自丹麦NUNC公司，型号：Maxisorp，酶标板板孔间的CV $\leq$ 10%。

③HRP标记抗人IgG抗体：采购商用，RZ值 $\geq$ 3.0，ELISA的最小滴度为1:30000。

④抗体稀释液：采购商用产品，室温保存。用它将HRP标记抗人IgG抗体稀释，将稀释液置于37℃加速试验7天后，测试室内质控样品，应与现配的HRP标记抗人IgG抗体稀释液测试的室内质控样品相比，结果无统计学上的差异。

⑤收集RA病人血清：病人血清为医院确诊的类风湿性关节炎患者的血清，患者符合1987年美国风湿病协会修订的RA分类诊断标准。所有血清经鉴定均为甲肝、乙肝、丙肝、艾滋病毒阴性，血清中不含传染源。分装后，-20℃长期贮存。

⑥收集的正常人血清：正常人血清为医院收集的健康献血者血清，分装后，-20℃长期贮存。

⑦牛血清白蛋白：纯度大于90%，2~8℃贮存。

⑧其他所用试剂：均为市售分析纯试剂。生产中配制溶液所用的水一律为本公司自制的纯化水。

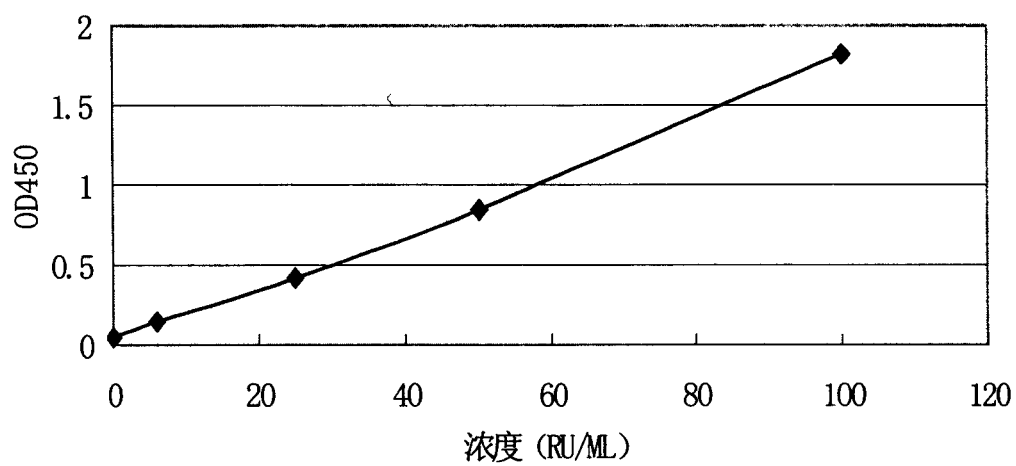


图 1

专利名称(译)	诊断RA的检测试剂盒、制备及完成质量检测标准的方法		
公开(公告)号	CN1796997A	公开(公告)日	2006-07-05
申请号	CN200410093354.1	申请日	2004-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
[标]发明人	倪健 杨子义 魏国兰 罗鹏		
发明人	倪健 杨子义 魏国兰 罗鹏		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/48 C07K16/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于类风湿性关节炎的诊断试剂盒及其制备及完成质量检测标准的方法。所述试剂盒是检测抗环瓜氨酸肽抗体的检测试剂盒。检测试剂盒的制备方法包括包被抗原、制备对照物和配制液体试剂。所述质量检测标准包括成品逐批检定标准和成品周期检定标准。本发明的试剂盒具有很高的阳性预测值，并且操作简便，敏感度高，且能用于大批样品的快速检测，还可同时对抗CCP抗体进行定性和定量检测，满足不同需要。

