



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109444404 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811143858.8

(22)申请日 2018.09.29

(71)申请人 江苏齐耀生物科技有限公司
地址 212400 江苏省镇江市句容市宝华镇
仙林东路9号双创大厦1012

(72)发明人 柏锦程 张振

(74)专利代理机构 南京利丰知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32256
代理人 任立

(51) Int. Cl.
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

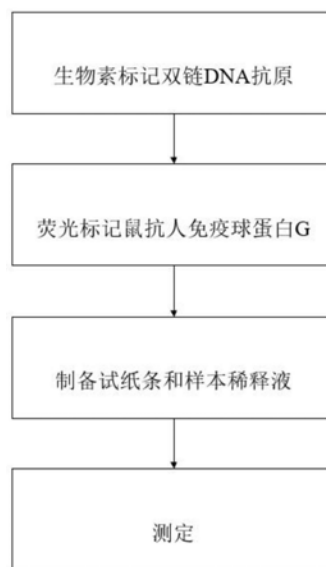
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种抗双链DNA抗体快速检测方法

(57)摘要

本发明公布了一种抗双链DNA抗体快速检测方法, DNA提取步骤包括:生物素标记双链DNA抗原、荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G、制备试纸条和样本稀释液、测定, 利用离心管、离心机、水浴箱、电子pH计、荧光免疫分析仪、连续点膜喷金一体机, 再加上相应的试剂和材料进行快速而准确的检测。本发明试纸条进行检测, 时间很短, 利用生物素标记质粒双链DNA对链霉亲和素蛋白进行固定, 以提高灵敏度, 试纸条和样本稀释液可提前制备且便于存储, 使用时取用方便, 提供一种操作简便、节约时间、检测准确性高的抗双链DNA抗体快速检测方法。



1. 一种抗双链DNA抗体快速检测方法,其特征在于:所需试剂和材料包括:质粒、重蒸水、缓冲液、限制性内切酶、乙二胺四乙酸、无水乙醇、乙醇溶液、生物素酰水溶撤肼、戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、F1-Y030微球溶液、N-羟基琥珀酰亚胺溶液、NaOH溶液、NH₄Cl溶液、待标记抗体、PBS缓冲液、牛血清白蛋白溶液、链霉亲和素、羊抗鼠免疫球蛋白G、NC膜、样本垫、吸水纸、NaN₃、PVC底板,所需设备包括:离心管、离心机、水浴箱、电子pH计、荧光免疫分析仪、连续点膜喷金一体机。

2. 根据权利要求1所述的一种抗双链DNA抗体快速检测方法,其特征在于:所述方法如下:

(一) 生物素标记双链DNA抗原:将质粒与重蒸水加入离心管并将二者融合,再加入缓冲液以及限制性内切酶,混合均匀后利用离心机进行轻微离心使得溶液集中,并在37℃下静置3小时,然后加入乙二胺四乙酸溶液并混合均匀,再加入无水乙醇混合均匀后放入水浴箱内冰浴3分钟,之后用离心机在11000r/min下离心处理6分钟,再用75%的乙醇溶液洗涤处理后的双链DNA沉淀,再用离心机在11000r/min下离心处理3分钟,去除上清液后晾干双链DNA沉淀;将生物素酰肼水溶液:戊二醛:双链DNA按照5:6:10的比例进行混合均匀,并放入水浴箱中在37℃下10min,最后将混合溶液进行1×PBS透析,以得到被生物素标记的双链DNA抗原;

(二) 荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G:将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、F1-Y030微球溶液、N-羟基琥珀酰亚胺溶液混合均匀并在35℃下反应20分钟,然后加入NaOH溶液,在pH计的检测下将混合溶液的pH值调整到7.2-7.4之间,按照所需标记比例将向混合溶液中加入待标记的抗体,在30℃下反应30分钟,反应后加入NH₄Cl溶液,同样在30℃下静置15分钟,以终止反应,然后进行PBS缓冲液透析并回收混合溶液,然后加入牛血清白蛋白溶液,将混合溶液保持与4℃的环境下;

(三) 制备试纸条和样本稀释液:利用连续点膜喷金一体机将链霉亲和素与羊抗鼠免疫球蛋白G划线在NC膜的指定位置上,然后37℃下烘干5小时,按照样品垫、NC膜及吸水纸的顺序将三者从左到右排列在PVC底板上,且三者交界处有1mm的重叠宽度,将其裁剪成4mm宽制成试纸条,并装入塑料卡壳再用铝箔袋每个单独密封,存储于4℃的温度下;将牛血清白蛋白、步骤(一)制备的生物素标记双链DNA抗原与步骤(二)制备的荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G混合并加入NaN₃防腐剂制成样本稀释液,并保存在4℃的温度下;

(四) 测定:从4℃的保存条件下取出步骤(三)试纸条和样本稀释液并使其温度恢复至室温,将待测样本加入到样本稀释液中,混合均匀,并在混合后将其滴在试纸条的样本孔上,15分钟后将试纸条放入荧光免疫分析仪中进行检测。

3. 根据权利要求1、2所述的一种抗双链DNA抗体快速检测方法,其特征在于:所述步骤(四)中,待测样本与样本稀释液混合稀释比例经过研究确定为1:49。

一种抗双链DNA抗体快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及快速检测领域,尤其涉及抗双链DNA抗体快速检测方法。

背景技术

[0002] 现在社会生活中,人们对身体健康格外看重,而疾病对健康的威胁却一直没有减少,尤其是自身免疫性疾病,许多疾病陆续被定义为自身免疫性疾病,为了遏制自身免疫性疾病继续危害人们的健康,提高医疗水平,改善人们的健康水平,对自身免疫性疾病的提前诊断进行了大量的研究,以求遭到准确快捷的诊断方法。

[0003] 自身免疫性疾病是由于对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织受到损害而形成的疾病,具体临床表现为器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病,而系统性自身免疫病又包括:系统性血管炎、甲状腺自身免疫疾病、天疱疮、系统性红斑狼疮等,这些疾病的病因有自身抗原的出现、免疫调节异常、交叉抗原以及遗传因素,通过进行抗双链DNA抗体检测可提前发现自身免疫性疾病的存在,已采取相应措施。

[0004] 对于系统性红斑狼疮的诊断而言,抗双链DNA抗体是一项重要指标,其具有相当高的特异性,容易被检测,同时与系统性红斑狼疮又有一定联系,会随该疾病的活动程度而发生变化,因此,对双链DNA抗体进行检测,可快速准确的判断系统性红斑狼疮。

[0005] 目前进行诊断检测的方法主要有化学发光分析法、酶联免疫吸附测定、胶体金免疫层析法、免疫荧光分析法、间接免疫荧光法等,其中在临床上应用最为广泛的是间接免疫荧光法,该方法灵敏度高,但其过程包括手工操作和荧光显微镜观察,同时需要丰富的经验,收到多种因素的影响,存在操作时间长的缺陷,酶联免疫吸附测定法也是一种较为常见的临床方法,但与间接免疫荧光法一样,存在耗时较长、影响就医,导致病情恶化,其他方法虽然较为快捷,但在实际应用当中存在较多限制,有些方法并不成熟,需要进一步研究探索,诊断的准确性有待进一步提高,因此,目前对于系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的诊断检测,准确性高的方法耗时较长,而方便快捷的方法有不成熟,需要进一步的对其准确性进行提高,缺乏一种准确性高且方便快捷,耗时较少的诊断方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是解决系统性红斑狼疮在检测中存在的检测准确性低、操作繁琐、耗时间长的问题,提供一种操作简便、节约时间、检测准确性高的抗双链DNA抗体快速检测方法。

[0007] 本发明所采用的技术方案:一种抗双链DNA抗体快速检测方法,所需试剂和材料包括:质粒、重蒸水、缓冲液、限制性内切酶、乙二醇四乙酸、无水乙醇、乙醇溶液、生物素酰水溶撤肼、戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、F1-Y030微球溶液、N-羧基琥珀酰亚胺溶液、NaOH溶液、NH₄Cl溶液、待标记抗体、PBS缓冲液、牛血清白蛋白溶液、链霉亲和素、羊抗鼠免疫球蛋白G、NC膜、样本垫、吸水纸、NaN₃、PVC底板,所需设备包括:离心管、离心机、水浴箱、电子pH计、荧光免疫分析仪、连续点膜喷金一体机。

[0008] 本发明一种抗双链DNA抗体快速检测方法如下：

[0009] (一) 生物素标记双链DNA抗原：将质粒与重蒸水加入离心管并将二者融合，再加入缓冲液以及限制性内切酶，混合均匀后利用离心机进行轻微离心使得溶液集中，并在37℃下静置3小时，然后加入乙二胺四乙酸溶液并混合均匀，再加入无水乙醇混合均匀后放入水浴箱内冰浴3分钟，之后用离心机在11000r/min下离心处理6分钟，再用75%的乙醇溶液洗涤处理后的双链DNA沉淀，再用离心机在11000r/min下离心处理3分钟，去除上清液后晾干双链DNA沉淀；将生物素酰肼水溶液：戊二醛：双链DNA按照5:6:10的比例进行混合均匀，并放入水浴箱中在37℃下10min，最后将混合溶液进行1×PBS透析，以得到被生物素标记的双链DNA抗原。

[0010] (二) 荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G：将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、F1-Y030微球溶液、N-羟基琥珀酰亚胺溶液混合均匀并在35℃下反应20分钟，然后加入NaOH溶液，在pH计的检测下将混合溶液的pH值调整到7.2-7.4之间，按照所需标记比例将向混合溶液中加入待标记的抗体，在30℃下反应30分钟，反应后加入NH₄Cl溶液，同样在30℃下静置15分钟，以终止反应，然后进行PBS缓冲液透析并回收混合溶液，然后加入牛血清白蛋白溶液，将混合溶液保持与4℃的环境下。

[0011] (三) 制备试纸条和样本稀释液：利用连续点膜喷金一体机将链霉亲和素与羊抗鼠免疫球蛋白G划线在NC膜的指定位置上，然后37℃下烘干5小时，按照样品垫、NC膜及吸水纸的顺序将三者从左到右排列在PVC底板上，且三者交界处有1mm的重叠宽度，将其裁剪成4mm宽制成试纸条，并装入塑料卡壳再用铝箔袋每个单独密封，存储于4℃的温度下；将牛血清白蛋白、步骤(一)制备的生物素标记双链DNA抗原与步骤(二)制备的荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G混合并加入NaN₃防腐剂制成样本稀释液，并保存在4℃的温度下。

[0012] (四) 测定：从4℃的保存条件下取出步骤(三)试纸条和样本稀释液并使其温度恢复至室温，将待测样本加入到样本稀释液中，混合均匀，并在混合后将其滴在试纸条的样本孔上，15分钟后将试纸条放入荧光免疫分析仪中进行检测。

[0013] 所述步骤(四)中，待测样本与样本稀释液混合稀释比例经过研究确定为1:49。

[0014] 本发明的有益效果：(1) 本发明中样本吸收液和试纸条可提前制备，且便于保存，取用方便，简化了检测时的步骤；(2) 本发明利用试纸条进行检测，时间很短；(3) 利用生物素标记质粒双链DNA对链霉亲和素蛋白进行固定，确保了检测准确度满足临床需求。

附图说明

[0015] 图1是本发明的流程示意图。

具体实施方式：

[0016] 下面结合附图与具体实例对本发明进行详细说明。

[0017] 本发明结合实例进行说明，所需试剂和材料包括：质粒、重蒸水、缓冲液、限制性内切酶、乙二胺四乙酸、无水乙醇、乙醇溶液、生物素酰肼水溶液、戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、F1-Y030微球溶液、N-羟基琥珀酰亚胺溶液、NaOH溶液、NH₄Cl溶液、待标记抗体、PBS缓冲液、牛血清白蛋白溶液、链霉亲和素、羊抗鼠免疫球蛋白G、NC膜、样品垫、吸水纸、NaN₃、PVC底板，所需设备包括：离心管、离心机、水浴箱、电子pH计、荧

光免疫分析仪、连续点膜喷金一体机。

[0018] 本发明一种抗双链DNA抗体快速检测方法步骤如下：

[0019] (一) 生物素标记双链DNA抗原：将质粒与重蒸水加入离心管并将二者融合，再加入缓冲液以及限制性内切酶，混合均匀后利用离心机进行轻微离心使得溶液集中，并在37℃下静置3小时，然后加入乙二醇四乙酸溶液并混合均匀，再加入无水乙醇混合均匀后放入水浴箱内冰浴3分钟，之后用离心机在11000r/min下离心处理6分钟，再用75%的乙醇溶液洗涤处理后的双链DNA沉淀，再用离心机在11000r/min下离心处理3分钟，去除上清液后晾干双链DNA沉淀；将生物素酰肼水溶液：戊二醛：双链DNA按照5:6:10的比例进行混合均匀，并放入水浴箱中在37℃下10min，最后将混合溶液进行1×PBS透析，以得到被生物素标记的双链DNA抗原。

[0020] (二) 荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G：将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、F1-Y030微球溶液、N-羟基琥珀酰亚胺溶液混合均匀并在35℃下反应20分钟，然后加入NaOH溶液，在pH计的检测下将混合溶液的pH值调整到7.2-7.4之间，按照所需标记比例将向混合溶液中加入待标记的抗体，在30℃下反应30分钟，反应后加入NH₄Cl溶液，同样在30℃下静置15分钟，以终止反应，然后进行PBS缓冲液透析并回收混合溶液，然后加入牛血清白蛋白溶液，将混合溶液保持与4℃的环境下。

[0021] (三) 制备试纸条和样本稀释液：利用连续点膜喷金一体机将链霉亲和素与羊抗鼠免疫球蛋白G划线在NC膜的指定位置上，然后37℃下烘干5小时，按照样品垫、NC膜及吸水纸的顺序将三者从左到右排列在PVC底板上，且三者交界处有1mm的重叠宽度，将其裁剪成4mm宽制成试纸条，并装入塑料卡壳再用铝箔袋每个单独密封，存储于4℃的温度下；将牛血清白蛋白、步骤(一)制备的生物素标记双链DNA抗原与步骤(二)制备的荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G混合并加入NaN₃防腐剂制成样本稀释液，并保存在4℃的温度下。

[0022] (四) 测定：从4℃的保存条件下取出步骤(三)试纸条和样本稀释液并使其温度恢复至室温，将待测样本加入到样本稀释液中，混合均匀，并在混合后将其滴在试纸条的样本孔上，15分钟后将试纸条放入荧光免疫分析仪中进行检测。

[0023] 所述步骤(四)中，待测样本与样本稀释液混合稀释比例经过研究确定为1:49。

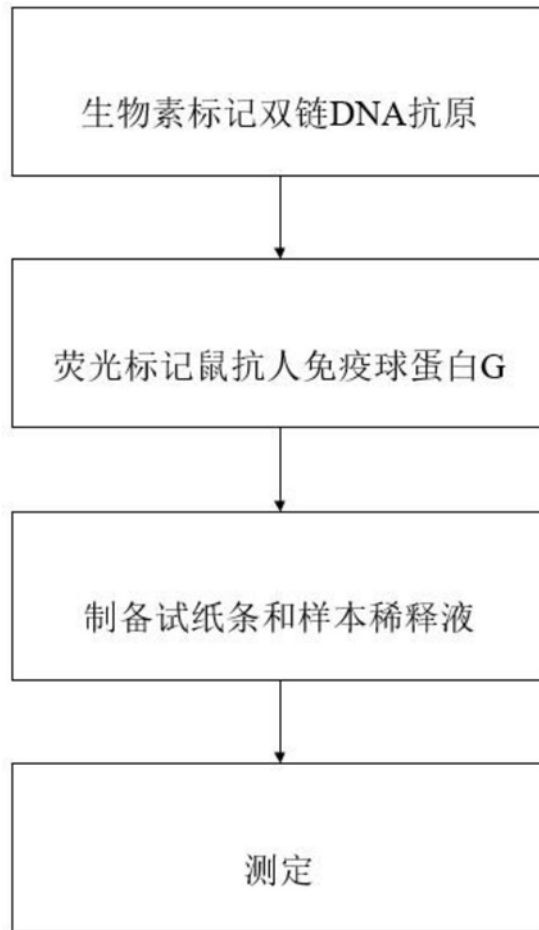


图1

专利名称(译)	一种抗双链DNA抗体快速检测方法		
公开(公告)号	CN109444404A	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201811143858.8	申请日	2018-09-29
[标]发明人	柏锦程 张振		
发明人	柏锦程 张振		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
代理人(译)	任立		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明专利公布了一种抗双链DNA抗体快速检测方法，DNA提取步骤包括：生物素标记双链DNA抗原、荧光标记鼠抗人免疫球蛋白G、制备试纸条和样本稀释液、测定，利用离心管、离心机、水浴箱、电子pH计、荧光免疫分析仪、连续点膜喷金一体机，再加上相应的试剂和材料进行快速而准确的检测。本发明试纸条进行检测，时间很短，利用生物素标记质粒双链DNA对链霉亲和素蛋白进行固定，以提高灵敏度，试纸条和样本稀释液可提前制备且便于存储，使用时取用方便，提供一种操作简便、节约时间、检测准确性高的抗双链DNA抗体快速检测方法。

