

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53
G01N 33/531

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01109087.1

[43] 公开日 2001年8月1日

[11] 公开号 CN 1306212A

[22] 申请日 2001.2.28 [21] 申请号 01109087.1

[71] 申请人 崔京涛

地址 100730 北京市东城区帅府园1号北京协和医院检验科荧光免疫室

共同申请人 王慧珍 李永哲

[72] 发明人 崔京涛 王慧珍 李永哲

[74] 专利代理机构 北京科龙环宇专利事务所

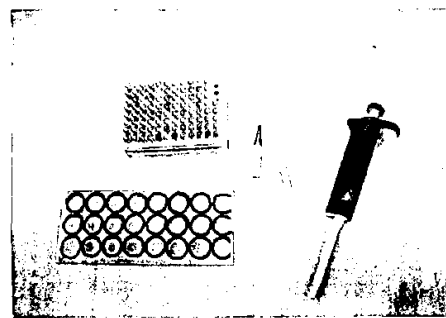
代理人 孙皓晨

权利要求书1页 说明书5页 附图页数1页

[54] 发明名称 检测脱氧核糖核蛋白抗体的免疫乳胶试剂及其制备与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种用于系统性红斑狼疮(SLE)诊断的一种新方法,利用脱氧核糖核蛋白(DNP)抗原,致敏聚苯乙烯乳胶制备成抗DNP抗体乳胶凝集试剂,用该试剂可以检测LE细胞形成过程中的重要因素LE因子(DNP抗体),该DNP乳胶凝集试验敏感性、特异性高于传统的LE细胞检查法。



乳胶凝集试验检测抗DNP抗体试剂及实验材料

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1、用于 DNP 抗体检测的免疫乳胶试剂的制备方法，其特征在于由下列步骤制备的：

A. DNP 抗原的提取； B. DNP 乳胶致敏。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中 A 步骤包括将新鲜小牛胸腺剪碎，加入氯化钠，慢速匀浆 3 次，过滤，高速离心，弃上清，沉淀加氯化钠匀浆，高速离心，弃沉淀，加蒸馏水于上清液中，4℃过夜，高速离心，沉淀加入氯化钠溶解。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于 B 步骤包括物理方法或化学方法。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于物理方法是用蒸馏水稀释物理乳胶，加入磷酸缓冲液（PB），边搅拌边加入 DNP 抗原，放 37℃水浴 30 分钟，离心 3000 转，5 分钟，去上清，加入 PB 至原体积，用于 DNP 阳性血清测试。

5、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于化学方法是用蒸馏水稀释化学乳胶，加入 PB，加环氧氯丙烷，搅拌 5 分钟，加聚乙二醇（PEG），搅拌 5 分钟，加入 DNP 抗原，搅拌 30 分钟，离心 3000 转，5 分钟，去上清，加入 PB 至原体积，用于 DNP 阳性血清测试。

6、根据权利要求 1 所述方法获得的免疫乳胶试剂。

说明书

检测脱氧核糖核蛋白抗体的免疫乳胶试剂及其制备与应用

本发明涉及免疫诊断领域，涉及红斑狼疮的诊断，具体地说涉及利用脱氧核糖核蛋白（DNP）抗原，致敏聚苯乙烯乳胶制备的抗 DNP 抗体乳胶凝集试剂，还涉及该乳胶试剂在临床诊断系统性红斑狼疮中的应用。

1948 年美国学者 Hargraves 等首先在 SLE 患者的骨髓和胸水中发现 LE 细胞现象。LE 细胞形成原理在于 LE 因子（即 IgG 类的抗脱氧核糖核蛋白抗体）在补体辅助下与中性粒细胞核内的 DNA 组蛋白复合物（DNP）起作用，使核发生肿胀、变碱，中性粒细胞分裂溶解，形成均匀游离体（均匀体）。均匀体再被中性粒细胞吞噬，并将细胞核推向一边，形成典型的 LE 细胞现象。LE 细胞发现奠定了 SLE 的自身免疫的基础。LE 细胞除在 50-60% 的 SLE 出现外，也可在其他结缔组织病（CTD），如干燥综合征（SS）、混合性结缔组织病（MCTD）等病中出现，但阳性率很低。虽然 LE 细胞的特异性和敏感性不如十年后发现（Frison 等，1957 年）并发展起来的间接免疫荧光技术（IFA）测定抗核抗体（ANA）试验，加之传统的 LE 细胞检查法操作繁杂，但国内外 SLE 诊断标准中一直将 LE 细胞阳性做为 SLE 诊断的实验室指标之一。同其他实验室指标如 ANA、抗 ds-DNA 抗体、抗 Sm 抗体、狼疮带试验（LBT）并用，可大大提高诊断 SLE 的特异性。因此，LE 细胞检查对 SLE 诊断仍有重要意义。为提高 LE 细胞检查敏感性、特异性，我们用简单、快速的抗 DNP 抗体乳胶凝集试验替代了沿用至今近 40 年的传统 LE 细胞检查法。

本发明的目的在于提供了一种用于 DNP 抗体检测的免疫乳胶试剂。

本发明的又一目的是应用前面所述的免疫乳胶试剂临床诊断系统性红斑狼疮疾病。

本发明是按照如下所述实现的：

一、DNP 乳胶的制备

1、DNP 抗原提取：

新鲜小牛胸腺（去脂肪和结缔组织），剪碎加入 0.14M 氯化钠，匀浆慢速 3 次，每次 30 秒，8 层纱布过滤，高速离心，3000 转，1 小时，弃上清，沉淀加 1M 氯化钠，匀浆全速 3 次，每次 30 秒，高速离心，3000 转，1 小时，弃沉淀，加蒸馏水于上清液中（蒸馏水：上清液=6:1），4℃ 下过夜，高速离心，3000 转，1 小时，沉淀加入 1M 氯化钠溶解。

2、DNP 抗原鉴定：

DNP 抗原提取后，必须通过以下 6 种试验：

A. DNP 含量测定：取 DNP 抗原 3ml 用分光光度计测其蛋白含量，在其 260nm、280nm 处分别测 OD 值后，用公式 $280 \text{ nm OD} \times 1.45 - 260 \text{ nm OD} \times 0.74$ 即可计算 DNP 含量。

B. DNA 酶和 RNA 酶消化试验：DNP 乳胶 100 μ l 加入 DNA 酶（RNA 酶）100 μ l，置室温 30 分钟后离心 1500rpm 5 分钟，弃上清，加 PB 缓冲液 100 μ l 后用 DNP 抗体阳性病人血清做琼脂扩散。

C. 组蛋白测定试验：以 2.5mg/ml 组蛋白抗原 200 μ l 包被聚苯乙烯微孔板，置 4 $^{\circ}$ C 20 小时后，弃去抗原包被液，加入明胶液以阻断未被抗原包被的部分，次日加入 DNP 抗原 200 μ l 置室温 2 小时，经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后，加入最适工作浓度 HRP 标记的羊抗人 IgG 200 μ l，置室温 2 小时后，分别以 PBS-吐温和 PBS 溶液冲洗各 3 次，加入底物液 200 μ l，置室温 2 小时后，以 410nm 测定各孔的吸光度（A）。

D. 对流电泳试验：在对流免疫电泳琼脂板上靠近负极的孔中加入 DNP 抗原，正极端孔中加入 DNP 抗体阳性血清，以注满小孔为度，按琼脂板长度电压 4-6v/cm，电泳 45-60 分钟，后观察结果，在黑色背景上方，可见两孔间形成抗原-抗体复合物的乳白色沉淀线。

E. 对照试验：用 DNP 乳胶 20 μ l 分别入 DNP 抗体阳性血清和阴性血清，混匀后，阳性血清出现颗粒凝集，阴性则无凝集。

F. 致敏试验：参见 DNP 乳胶致敏方法。

3、DNP 乳胶致敏方法：

A. 物理方法

蒸馏水 10 倍稀释物理乳胶，加 0.2M PH 5.7 PB，搅拌下加 DNP 抗原，放 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，离心 3000 转，5 分钟，去上清，加 0.01M PH 5.7 PB 至原体积，DNP 阳性血清测试。

B. 化学方法

蒸馏水 10 倍稀释化学乳胶，加 0.2M PH 5.7 PB，加环氧氯丙烷，搅拌 5 分钟，加 PEG 搅拌 5 分钟，加入 DNP 抗原，搅拌 30 分钟，离心 3000 转，5 分钟，去上清，加 0.01M PH 5.7 PB 至原体积，DNP 阳性血清测试。

二、应用 DNP 乳胶试剂检测红斑狼疮

1、操作步骤

(1) 自 4 $^{\circ}$ C 冰箱中取出 DNP 乳胶试剂，将乳胶充分摇匀，并置室温中平衡温度后待用。

(2) 将被检血清 20 μ l 和 DNP 乳胶试剂 20 μ l 滴加于洁净玻璃片上，用竹签或塑料棒混匀涂成 2cm 直径的圆斑。

(3) 缓缓旋转摇动玻璃板 1 分钟后，在黑色背景下肉眼观察是否有凝集反应。

(4) 被检阳性血清若需做半定量测定，可将血清做倍比稀释，重复上法测定，以出现凝集的血清最高稀释度为抗 DNP 抗体滴度。

2、结果判断

阳性时乳胶出现明显的凝集颗粒；阴性时乳胶呈均匀悬液状态。

(-) 乳胶均匀，无肉眼可见的凝集颗粒（有时可以出现极细均匀的颗粒）。

(+) 肉眼可见较细的凝集颗粒，背景混浊。

(++) 肉眼可见大而清晰的凝集颗粒，背景稍混。

(+++)¹ 肉眼可见大而清晰的凝集颗粒，背景澄清。

(++++)² 肉眼可见大而清晰的凝集块，背景澄清。

阳性结果报告方式可按凝集反应强弱报告 (-) — (++++)³；或按半定量反应结果报告抗 DNP 抗体滴度。

3、临床意义

(1) 正常人无此抗体，阳性时主要见于系统性红斑狼疮，尤其活动期 SLE，阳性率可达 88.8%。其它结缔组织病等有时可见阳性，阳性率低，且部分病人合并 SLE 症状。某些结缔组织病（如肝炎）等偶见阳性。

(2) 抗 DNP 抗体乳胶凝集试验为 SLE 的十分重要的过筛试验。阳性结果，特别是 (++) 以上时要高度考虑 SLE 的诊断；阴性结果时，SLE 的诊断要慎重。

4、注意事项

(1) 每次实验必须设阳性和阴性对照，一切实验用品（玻璃板、搅拌棒等）应洁净、干燥。

(2) DNP 乳胶试剂应置 4℃ 保存，严禁冻结（乳胶试剂冻结→融化，可使致敏乳胶的 DNP 抗原脱落，而致乳胶试剂失效）。

(3) DNP 乳胶试剂有效期 6 个月。若阳性对照血清或生理盐水对照出现明显凝集现象则表示该试剂有质量问题，不能再使用。

与现有技术相比，应用本发明的 DNP 乳胶试剂替代传统的狼疮细胞检测方法，由于 DNP 乳胶凝集试验操作简易、使用方便，不需任何特殊设备，为红斑狼疮诊断、治疗提供了一种快速敏感的实验室指标。该产品质量稳定、特异性强、效果良好。

实施例

DNP 乳胶试剂用于检测红斑狼疮

按照“发明技术方案”所述的检测方法以及 LE 细胞检查法进行比较检测，共检测了 71 例 SLE 患者，其比较结果见表 1 和表 2

表 1 71 例 SLE 患者两种方法检测阳性率比较

抗 dsDNA 抗体 (结合率%)	例数	LE 细胞阳性率	抗 DNP 抗体阳性率
>40%	18	83%	94.4%
20-40%	18	33%	66%
<20%	35	11.4%	40%

表 2 468 份血清两方法检测阳性率比较

n=468	DNP 乳胶试验			
	-	+	++	+++
LEC (-)	267	33	49	7
LEC (+)	5	24	67	18

完全符合 374 份, 占 80%; DNP 乳胶试验阳性, LE 细胞阴性 89 份; 占 19%; LE 细胞阳性, DNP 试验阴性 5 份, 占 1%。

由以上两表可见, DNP 乳胶凝集实验敏感性、特异性均高于 LE 细胞检测法, 假阴性率仅为 1%, 可完全替代 LE 细胞检查法。

抗 DNP 抗体临床意义

正常人无此抗体, 阳性时主要见于 SLE, 尤其活动期 SLE 阳性率可达 88.8%。解放军 205 医院应用本发明制备的 DNP 乳胶试剂, 观察抗 DNP 抗体在活动期 SLE 阳性率为 92.8% (见《中华医学会第四次全国风湿病学术会议论文汇编》P140 页)。抗 DNP 抗体在其它 CTD (如 SS、MCTD 等) 有时可见阳性, 但阳性率低; 在某些非 CTD (如肝炎、白血病等) 偶见阳性。

抗 DNP 抗体与抗核抗体 (ANA) 滴度无关, ANA 阴性, 低滴度也可阳性; 与 ANA 染色模型 (均质型)、抗 ds-DNA 抗体阳性 (结合率) 30%、LE 细胞试验结果阳性有密切关系。

LE 细胞在病情重 (活动期), 又未用过激素治疗的 SLE 患者血中容易找到, 其阳性率可达 50%-70%; 在病情缓解或服用激素治疗患者血中则不易找到。在一些其它 CTD (如肝炎、结核、肾炎、白血病等) 中都可以有 LE 细胞阳性发现。因此, 很多病人甚至医生把找到 LE 细胞看成是诊断 SLE 的唯一标准或未查到 LE 细胞就不是 SLE, 这显然是不合适的。同样, 抗 DNP 抗体亦是如此。阳性结果。特别是 (++) 以上时要高度考虑 SLE 诊断, 并进一步检查诊

断 SLE 的其它实验室指标（如 ANA、抗 ds-DNA 抗体、抗 Sm 抗体及狼疮带试验等）；阴性时，SLE 的诊断应慎重。

表 3 778 份血清抗 DNP 抗体乳胶凝集实验检测结果

检测对象	例数	阳性数	阳性率
系统性红斑狼疮（SLE）活动期	170	151	88.8%
系统性红斑狼疮（SLE）非活动期	250	51	20.4%
干燥综合症（SS）	68	8	12.1%
混合性结缔组织病（MCTD）	30	2	6.7%
类风湿关节炎（RA）	52	2	3.8%
硬皮病（PSS）	34	1	2.9%
皮炎/多发性肌炎（PM/DM）	21	1	4.7%
肝炎	25	1	4.0%
其它风湿性疾病	30	1	3.3%
献血员	100	1	1.0%

（DNP 乳胶凝集试验敏感、特异、简便、快速，是一个十分有用的筛选试验，可用于最基层的医疗单位，替代传统的 LE 细胞检查法，对 SLE 诊断和鉴别诊断有重要帮助。）

附图说明：

图 1 是乳胶凝集试验检测抗 DNP 抗体试剂及实验材料；

图 2 是乳胶凝集试验检测抗 DNP 抗体：阳性（左）、阴性（右）。

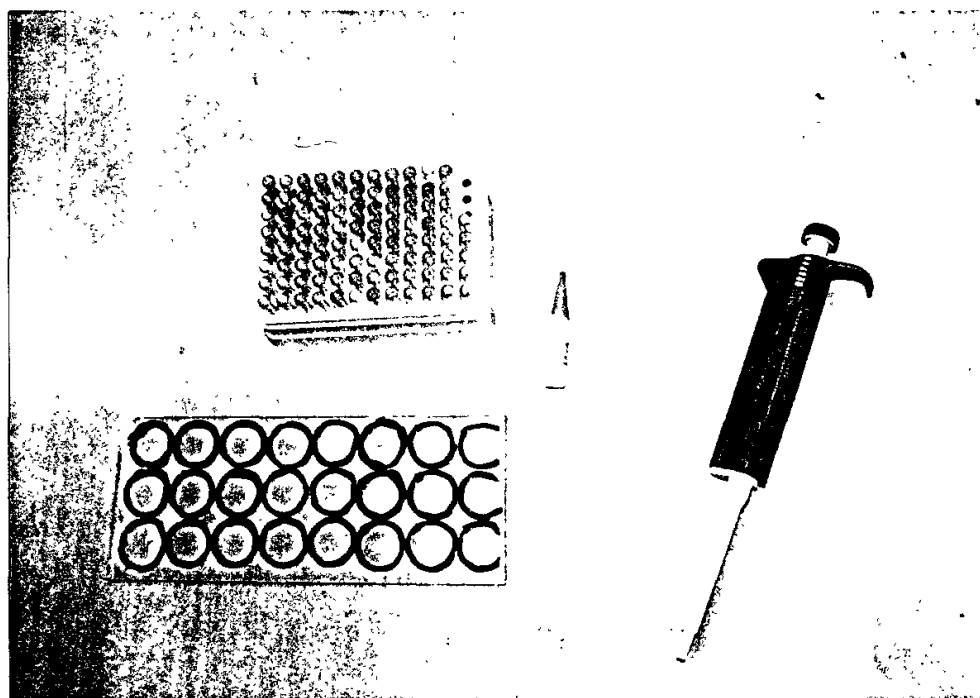


图 1 乳胶凝集试验检测抗DNP抗体试剂及实验材料

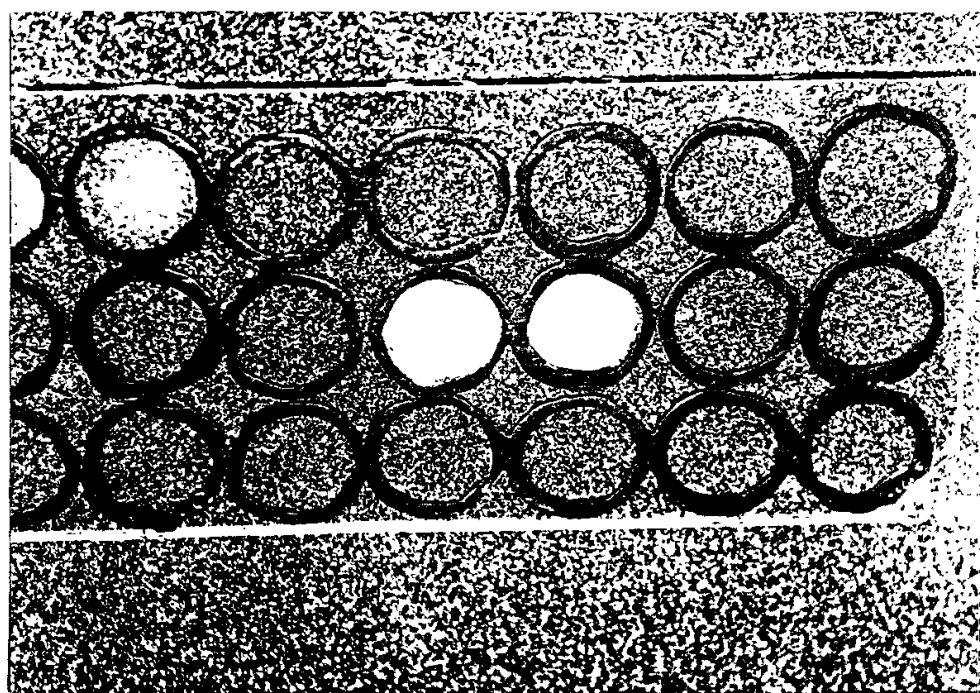


图 2 乳胶凝集试验检测抗DNP抗体：阳性（左）、阴性（右）

专利名称(译)	检测脱氧核糖核蛋白抗体的免疫乳胶试剂及其制备与应用		
公开(公告)号	CN1306212A	公开(公告)日	2001-08-01
申请号	CN01109087.1	申请日	2001-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	王慧珍 李永哲		
申请(专利权)人(译)	王慧珍 李永哲		
当前申请(专利权)人(译)	王慧珍 李永哲		
[标]发明人	崔京涛 王慧珍 李永哲		
发明人	崔京涛 王慧珍 李永哲		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/544		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN1120368C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于系统性红斑狼疮(SLE)诊断的一种新方法,利用脱氧核糖核蛋白(DNP)抗原,致敏聚苯乙烯乳胶制备成抗DNP抗体乳胶凝集试剂,用该试剂可以检测LE细胞形成过程中的重要因素LE因子(DNP抗体),该DNP乳胶凝集试验敏感性、特异性高于传统的LE细胞检查法。

