



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727843 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710949437.3

(22)申请日 2017.10.12

(71)申请人 苏州大学

地址 215137 江苏省苏州市相城区济学路8号

(72)发明人 戴克胜

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务有限公司 32103

代理人 孙周强 陶海锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

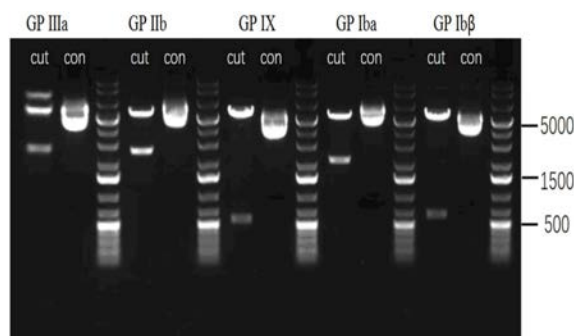
权利要求书2页 说明书9页  
序列表5页 附图5页

## (54)发明名称

检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用

## (57)摘要

本发明公开了检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用,具有较高的特异性和敏感性;采用基因重组和转染的方法使CHO细胞表达人血小板特异性受体膜糖蛋白GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa受体,将特异性膜糖蛋白受体表达阳性的CHO细胞与待测血清共孵育,最后加入荧光素标记的抗人免疫球蛋白多克隆抗体(二抗)结合。若血清或血浆中存在抗血小板受体特异性抗体则形成“CHO-膜糖蛋白特异性抗体-荧光素标记的抗人免疫球蛋白多克隆抗体”复合物结构,表现为CHO细胞荧光强度增高,可用流式细胞仪或荧光显微镜检测。本方法操作简便、特异性膜糖蛋白表达阳性CHO细胞来源充足、特异性和敏感性高、诊断效率高,可应用于基础研究和临床检测。



1. 检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂,其特征在于,所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂包括表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞以及荧光素标记的抗体。

2. 根据权利要求1所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂,其特征在于,所述人血小板特异性受体膜糖蛋白包括GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa;所述细胞包括中国地鼠卵巢细胞;所述荧光素包括异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明或藻红蛋白;所述荧光素标记的抗体包括荧光素标记的羊抗人、鼠抗人或者兔抗人免疫球蛋白单克隆或者多克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂,其特征在于,所述表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞的制备方法为,将编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因片段克隆进质粒载体得到重组质粒;然后将重组质粒转染细胞,得到转染细胞株;然后经过分选与培养得到表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞。

4. 根据权利要求3所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂,其特征在于,所述编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因片段包括人血小板膜蛋白GP Iba亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP Ibβ亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP IX亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP IIb亚基基因序列以及人血小板膜蛋白GP IIIa亚基基因序列中的一种或几种;所述质粒载体包括pcDNA3.3质粒载体。

5. 检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因片段克隆进质粒载体得到重组质粒;

(2) 将重组质粒转染细胞,得到转染细胞株;

(3) 将转染细胞株经过分选与培养得到表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞;

(4) 表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞与荧光素标记的抗体组成检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂。

6. 根据权利要求5所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂的制备方法,其特征在于,所述编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因序列包括人血小板膜蛋白GP Iba亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP Ibβ亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP IX亚基基因序列、人血小板膜蛋白GPIIb亚基基因序列、人血小板膜蛋白GPIIIa亚基基因序列中的一种或几种;所述质粒载体包括pcDNA3.3质粒载体。

7. 权利要求1所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂在检测抗血小板表面受体特异性自身抗体中的应用,或者权利要求1所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂在制备检测血小板表面特异性自身抗体制剂中的应用。

8. 检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂盒,其特征在于,所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂盒包括表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞、荧光素标记的抗体、缓冲液、封片剂。

9. 利用权利要求1所述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂检测血小板表面受体特异性自身抗体的方法,其特征在于,包括以下步骤,将待测样本与表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞孵育,然后加入荧光素标记的抗体孵育;然后通过检测完成血小板表面受体特异性自身抗体的检测。

10. 表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞在制备检测抗血小板表面受体特异性自

身抗体试剂中的应用。

## 检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于检测抗血小板表面受体特异性自身抗体检测技术领域,具体涉及检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用,具有较高的特异性和敏感性。

### 背景技术

[0002] 出血性疾病是临床常见多发病,如若得不到快速诊断和及时干预可能会导致剧烈疼痛、脏器损伤甚至死亡。而全世界仅有约30%的出血性疾病患者得到了确诊。免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenic, ITP)是一种免疫介导的血小板减少综合征,是临床最常见的出血性疾病之一,可发生在各个年龄段,以女性多见。可分为急性和慢性两种类型,成人常见为慢性,儿童以急性多见。临床表现为皮肤多处瘀点、瘀斑,严重时出现颅内出血危及生命。该病的发病率为5~10/10万人口,中国约有150万患者。大部分ITP患者发病机制为患者体内存在抗血小板特异性抗体,抗体与血小板上抗原形成抗原抗体复合物,被免疫性系统识别,免疫细胞攻击血小板导致其被清除。因此,血小板特异性抗体可能是导致血小板数目减少的重要原因。

[0003] 现有的实验室检测血小板特异性抗体的方法有如下几种,最早的方法是检测ITP患者血清或血浆在体外对正常人血小板功能的影响,这种间接的检测方法敏感性和特异性很低,且干扰因素较多,已淘汰。后来采用酶联免疫法检测血清中抗血小板抗体,该方法敏感性较高,阳性率可达到80-90%,但特异性较差,因该方法检测的是抗血小板抗体,而非特异性吸附到血小板表面的免疫球蛋白。目前单克隆抗体特异性捕获血小板抗原实验(MAIPA)是检测血小板特异性抗体的常用方法;但该方法存在敏感性低、操作繁琐等不足。亟需研发一种操作简便、特异性和敏感性均较高的检测方法。

### 发明内容

[0004] 本发明公开了一种检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法,用于检测血清或血浆中游离血小板表面受体特异性自身抗体,具有较高特异性和敏感性,且操作简便,有效解决了现有双抗夹心检测法存在的敏感性低、操作繁琐等不足。

[0005] 本发明试剂盒包含表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞,这些细胞能够结合血清中抗游离血小板表面受体特异性自身抗体,最后通过荧光标记的二抗显色,即形成细胞-抗原-抗体-二抗复合物,并能够在荧光显微镜及流式细胞仪上应用,从而联合确定ITP(免疫性血小板减少)患者血清中游离的抗GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa抗体,结果可以明确诊断ITP患者亚类,指导用药治疗,也可以作为非疾病诊断指导人们健康生活。

[0006] 本发明检测用试剂具有较高的敏感性。研究表明,细胞表面表达的蛋白含量比传统ELISA方法包被的抗原量高至少4倍,客观上可以增加该检测方法的敏感性。本发明检测用试剂具有较高的特异性,经检测53例健康献血者以及102例ITP患者,ITP患者组荧光强度

高于健康献血者2-3倍,该试剂检测抗GP Ib-IX抗体的敏感性为85.2%,特异性为90.4%;检测抗GP IIb/IIIa抗体的敏感性为91.3%,特异性为95.2%;同时检测抗GP Ib-IX和GP IIb/IIIa抗体的敏感性为86.3%,特异性为95.2%;联合三种细胞同时检测抗GP Ib-IX、GP IIb/IIIa、GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa抗体,与临床符合率可达90%以上。用本试剂盒及检测方法用血量少,只要0.5ml血清;操作简便,不需要裂解血小板;用时较少,整个实验过程需大约2小时;已报道的方法多数采用双抗体夹心法检测与血小板结合的自身抗体,即包被抗体捕获裂解血小板的特异性抗原,若该抗原上结合了特异性自身抗体,则与二抗结合形成复合物,最后显色被检测,这种方法不能检测血清中游离的抗血小板自身抗体,需要制备病人的血小板裂解液,操作繁琐费时,本发明有效解决了这一缺陷。

[0007] 为达到上述发明目的,本发明采用如下技术方案:

一种检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂,包括表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞以及荧光素标记的抗体。

[0008] 优选的,所述人血小板特异性受体膜糖蛋白包括GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa;所述细胞包括中国地鼠卵巢细胞;所述荧光素包括异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明或者藻红蛋白;所述荧光素标记的抗体包括荧光素标记的羊抗人、鼠抗人、兔抗人免疫球蛋白多克隆抗体。

[0009] 上述技术方案中,所述表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞的制备方法为,将编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因片段克隆进质粒载体得到重组质粒;然后将重组质粒转染细胞,得到转染细胞株;然后经过分选与培养得到表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞。

[0010] 优选的,所述编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因序列包括人血小板膜蛋白GP Iba亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP Ibβ亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP IX亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP IIb亚基基因序列以及人血小板膜蛋白GPIIIa亚基基因序列中的一种或几种;所述质粒载体包括pcDNA3.3质粒载体。

[0011] 本发明还公开了一种检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因序列克隆进质粒载体得到重组质粒;

(2) 将重组质粒转染细胞,得到转染细胞株;

(3) 将转染细胞株经过分选与培养得到表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞;本发明表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞通过多聚甲醛固定后,可长期保持,用于检测;

(4) 表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞与荧光素标记的抗体组成检测游离抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂,可通过流式细胞仪、荧光显微镜等观察结果。

[0012] 优选的,所述编码人血小板特异性受体膜糖蛋白的基因序列包括人血小板膜蛋白GP Iba亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP Ibβ亚基基因序列、人血小板膜蛋白GP IX亚基基因序列、人血小板膜蛋白GPIIb亚基基因序列、人血小板膜蛋白GPIIIa亚基基因序列中的一种或几种;所述质粒载体包括pcDNA3.3质粒载体。

[0013] 本发明进一步公开了上述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂在检测抗血小板表面受体特异性自身抗体中的应用或者在制备检测血小板表面受体特异性自身

抗体制剂中的应用。

[0014] 本发明还公开了上述表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞在制备检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂中的应用。

[0015] 本发明还公开了一种检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂盒,包括表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞、荧光素标记的抗体、缓冲液、封片剂。

[0016] 本发明进一步公开了上述检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂检测血小板表面特异性自身抗体的方法,包括以下步骤,将待检测样本,血清或血浆与表达人血小板特异性受体膜糖蛋白的细胞孵育,然后加入荧光素标记的抗体孵育;然后通过仪器检测完成血小板表面特异性自身抗体的检测,比如通过荧光法或流式细胞术完成游离血小板表面受体特异性自身抗体的检测。

[0017] 上述技术方案中,通过荧光法检测时,若细胞膜显示绿色荧光则判定为阳性;通过流式细胞学法检测时,若荧光强度超过临界值则判定为阳性。

[0018] 上述技术方案可以具体包括如下步骤:

DNA片段的获取:合成人类血小板膜蛋白GP Iba亚基、GP Ibβ亚基、GP IX、GP IIb亚基、GP IIIa亚基基因序列,然后连接在载体 pcDNA3.3 上,构建pcDNA-GP Iba、pcDNA-GP Ibβ、pcDNA-GP IX、pcDNA-GP IIb和pcDNA-GP IIIa重组质粒,经过酶切和测序鉴定碱基序列准确无误。

[0019] 细胞转染:采用转染质粒的方法将带目的基因的重组质粒导入CHO细胞中,加入G418筛选混合阳性克隆。在阳性混合克隆的基础上,得到单细胞长出的阳性单克隆,最后获得稳定转染细胞株。

[0020] 细胞分选与蛋白表达:采用贝克曼库尔特MoFlo XDP 超速流式分选系统对表达阳性细胞进行分选和收集。分选后的细胞用含10%胎牛血清及PS的IMDM培养基进行培养。待细胞后进行下一次分选,总共分选8次,获得了稳定表达细胞株,根据重组质粒的选用可以得到表面表达相应蛋白的细胞,比如实施例的CHO-IbIX、CHO-IIbIIIa和CHO-123。

[0021] 稳定表达细胞株的保存:消化需要固定的阳性细胞,加入4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液4℃固定12h。该保存方法可以持续180天维持细胞目的蛋白表达率不低于80%。

[0022] 样本血清中游离血小板表面特异性自身抗体检测:固定后表达稳定的细胞(CHO-IbIX、CHO-IIbIIIa和CHO-123)与待测血清孵育,洗涤未结合的抗体,加入FITC-羊抗人IgG孵育。采用荧光显微镜直接观察,若细胞膜显示绿色荧光则判定为阳性,反之则为阴性;还可以采用流式细胞仪检测,若荧光强度超过临界值则判定为阳性,反之则为阴性。

[0023] 本发明采用基因重组和转染的方法促使CHO(中国地鼠卵巢细胞)表达人血小板特异性糖蛋白GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa。将特异性膜糖蛋白表达阳性CHO与待测血清共孵育,最后加入异硫氰酸荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白多克隆抗体(二抗)结合。若血清中存在抗血小板特异性抗体则形成“CHO-膜糖蛋白特异性抗体-异硫氰酸荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白多克隆抗体”复合物结构,表现为CHO细胞绿色荧光强度增高。本方法操作简便、特异性膜糖蛋白表达阳性CHO细胞来源充足、特异性和敏感性高、诊断效率高,可应用于基础研究和临床诊断实验。

## 附图说明

- [0024] 图1为实施例一重组质粒的酶切结果图；  
 图2为实施例一阳性细胞株分选结果图；  
 图3为实施例一流式细胞术分析细胞表面特异性蛋白表达情况图；  
 图4为实施例二中血清样本荧光图；  
 图5为实施例二中ROC曲线图；  
 图6为实施例二中流式细胞学方法检测结果图。

### 具体实施方式

- [0025] 实施例一检测游离抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂的制备  
 DNA片段的获取

从NCBI数据库中获得人类血小板膜蛋白GP Ib $\alpha$ 亚基,序列登录号:NM\_000173.6;人类血小板糖蛋白GP Ib $\beta$ 亚基,序列登录号:NM\_000407.4;人类血小板糖蛋白GP IX,序列登录号:NM\_000174.4;人类血小板整合素GP IIb亚基,序列登录号:NM\_000419.4;人类血小板整合素GP IIIa亚基,序列登录号:NM\_000212.2。提交基因公司合成,然后连接在载体pcDNA3.3上,构建pcDNA-GP Ib $\alpha$ 、pcDNA-GP Ib $\beta$ 、pcDNA-GP IX、pcDNA-GPIIb和pcDNA-GP IIIa重组质粒,经过酶切和测序鉴定碱基序列准确无误;pcDNA-GP Ib $\alpha$ 、pcDNA-GP Ib $\beta$ 、pcDNA-GP IX、pcDNA-GP IIb和pcDNA-GPIIIa重组质粒的测序序列分别如下,亦记载在核苷酸与氨基酸序列列表中的第1、第2、第3、第4、第5个DNA序列,酶切结果见附图1,说明合成GP Ib $\alpha$ 亚基、GP Ib $\beta$ 亚基、GP IX亚基、GP IIb亚基和GP IIIa亚基 DNA片段后,与pcDNA3.3构建重组质粒,用NheI和HindIII进行质粒酶切鉴定,均可释放与目的基因匹配的DNA片段。

- [0026] GP1b $\beta$ 序列 (621 nt):

```
ATGGGCTCCGGGCCGCGGGGGCGCTGAGCTTACTGCTCCTGCTGCTGGCCCCGCCGAGCCGCCCGCCGCGAG
GTTGCCCGGCGCCCTGTAGCTGCGCGGGGACGCTCGTGGACTGCGGGCGCCGCGGGCTGACTTGGGCCTCGCTGCCG
ACCGCCTTCCCTGTGACACAACCGAGCTGGTGCTGACCGGCAACAACCTGACGGCGCTGCCCGGGGGCTGCTGGA
CGCGCTGCCCGCGCTGCGCACCGCACACCTGGGCGCAACCCCTGGCGCTGCGACTGCCGCTTGTGCCGCTGCGCG
CCTGGCTGGCCGGCCCGGAGCGTGCGCCCTACCGCGACCTGCGTTGCGTGGCGCCCCAGCGCTGCGCGGCCGC
CTGCTGCCCTATCTGGCCGAGGACGAGCTGCGCGCCGCTTGCCTCCCGCCCGCTCTGCTGGGGGGCGCTGGCGGC
GCAGCTTGCGCTGCTGGGCTTGGGCTGCTGCACGCGTTGCTGCTGGTGTGCTGCTGTGCCGCTGCGGAGGCTGC
GGGCCCCGGGCCGCGCTCGCGCCGAGCCCGGCTGTCGCTGACCGACCCGCTGGTGGCCGAGCGAGCCGGAACCGAC
GAGTCCTGA
```

- GP1b $\alpha$ 序列 (1959 nt):

```
ATGCCTCTCTCTCTTGTGCTCCTGCTGCCAAGCCCCTTACACCCCCACCCCATCTGTGAGGTCTCCAAAG
TGGCCAGCCACCTAGAAAGTGAAGTGTGACAAGAGGAATCTGACAGCGCTGCCTCCAGACCTGCCGAAAGACACAACC
ATCCTCCACCTGAGTGAGAACCTCCTGTACACCTTCTCCCTGGCAACCCTGATGCCTTACACTCGCCTCACTCAGCT
GAACCTAGATAGGTGCGAGCTCACCAAGCTCCAGGTCGATGGGACGCTGCCAGTGTGGGACCCTGGATCTATCCC
ACAATCAGCTGCAAAGCCTGCCCTTGTAGGGCAGACACTGCCTGCTCTACCGTCTGGACGTCTCCTTCAACCGG
CTGACCTCGCTGCCTCTTGGTGCCTTGCCTGGTCTTGGCGAACTCCAAGAGCTCTACCTGAAAGGCAATGAGCTGAA
GACCCTGCCCCAGGGCTCCTGACGCCACACCCAAGCTGGAGAAGCTCAGTCTGGCTAACAACAACCTGACTGAGC
TCCCCGCTGGGCTCCTGAATGGGCTGGAGAATCTCGACACCCTTCTCCTCCAAGAGAAGTCTGCTGTATAACAATACCA
```

AAGGGCTTTTTGGGTCCCACCTCCTGCCTTTTGCTTTTCTCCACGGAACCCCTGGTTATGCAACTGTGAGATCCT  
CTATTTTCGTCGCTGGCTGCAGGACAATGCTGAAAATGTCTACGTATGGAAGCAAGGTGTGGACGTCAAGGCCATGA  
CCTCTAACGTGGCCAGTGTGCAGTGTGACAATTCAGACAAGTTTCCCGTCTACAAATACCCAGGAAAGGGGTGCCCC  
ACCCTTGGTGATGAAGGTGACACAGACCTATATGATTACTACCCAGAAGAGGACACTGAGGGCGATAAAGGTGCGTGC  
CACAAGGACTGTGGTCAAGTTCCCCACCAAAGCCCATACAACCCCTGGGGTCTATTCTACTCATGGTCCACTGCTT  
CTCTAGACAGCCAAATGCCCTCCTCCTTGATCCAACACAAGAATCCACTAAGGAGCAGACCACATTCCCACCTAGA  
TGGACCCCAAATTTCACTTTCACATGGAATCCATCACATTCTCCAAAATCCAAAATCCACTACTGAACCAACCC  
AAGCCCGACCACCTCAGAGCCCGTCCCGGAGCCCGCCCCAAACATGACCACCCTGGAGCCCACTCCAAGCCCGACCA  
CCCCAGAGCCACCTCAGAGCCCGCCCCAGCCGACCACCCCGGAGCCACCTCAGAGCCCGCCCCAGCCCGACC  
ACCCAGAGCCACCTCAGAGCCCGCCCCAGCCGACCACCCCGGAGCCACCCCAATCCCGACCATCGCCACAAG  
CCCAGCCATCCTGGTGTCTGCCACAAGCCTGATCACTCCAAAAGCACATTTTAACTACCACAAAACCCGTATCAC  
TCTTAGAATCCACCAAAAAAACCATCCCTGAACTTGATCAGCCACCAAAGCTCCGTGGGGTGTCCAAGGGCATTG  
GAGAGCTCCAGAAATGACCCTTTTCTCCACCCCGACTTTTGTGCCTCCTCCCCCTGGGCTTCTATGTCTTGGGTCT  
CTTCTGGCTGCTCTTTGCCTCTGTGGTCTCATCCTGCTGCTGAGCTGGGTGGGCATGTGAAACCACAGGCCCTGG  
ACTCTGGCCAAGGTGCTGCTCTGACCACAGCCACACAAACCACACACCTGGAGCTGCAGAGGGGACGGCAAGTGACA  
GTGCCCCGGCCTGGCTGCTTTCCTTCGAGGTTGCTTCCCACTTCCGCTCCAGCCTCTTCTGTGGGTACGGCC  
TAATGGCCGTGTGGGGCCTCTAGTGGCAGGAAGGAGCCCTCAGCTCTGAGTCAGGGTCGTGGTCAGGACCTGCTGA  
GCACAGTGAGCATTAGGTA CTCTGGCCACAGCCTCTGA

GP IX序列 (534 nt):

ATGCCTGCCTGGGGAGCCCTGTTCCCTGCTCTGGGCCACAGCAGAGGCCACCAAGGACTGCCCCAGCCCATGTA  
CCTGCCGCGCCCTGAAAACCATGGGGCTGTGGGTGGACTGCAGGGGCCACGGACTCACGGCCCTGCCTGCCCTGCCG  
GCCCCGACCCGCCACCTTCTGCTGGCCAACAACAGCCTTCAGTCCGTGCCCCGGGAGCCTTTGACCACCTGCCCCA  
GCTGCAGACCCTCGATGTGACGCAGAACCCTGGCACTGTGACTGCAGCCTCACCTATCTGCGCCTCTGGCTGGAGG  
ACCGCACGCCCCGAGGCCCTGCTGCAGGTCCGCTGTGCCAGCCCCAGCCTCGCTGCCATGGCCCCGTGGGCCGGCTG  
ACAGGCTACCAGCTGGGCAGCTGTGGCTGGCAGCTGCAGGCGTCTGGGTGCGCCCCGGGGTCTTGTGGGACGTGGC  
GCTGGTGCCTGTGGCCGCGCTGGGCCTGGCTCTTCTGGCTGGCCTGCTGTGTGCCACCACAGAGGCCCTGGATTGA

GP IIIa序列 (2367 nt):

ATGCGAGCGCGCCGCGGCCCGCCGCTCTGGGCGACTGTGCTGGCGCTGGGGGCGCTGGCGGGCGTTGGCG  
TAGGAGGGCCCAACATCTGTACCACGCGAGGTGTGAGCTCCTGCCAGCAGTGCCCTGGCTGTGAGCCCCATGTGTGCC  
TGGTGCTCTGATGAGGCCCTGCCTCTGGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAAGGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGC  
CCCAGAATCCATCGAGTTCCAGTGAGTGAGGCCCGAGTACTAGAGGACAGGCCCTCAGCGACAAGGGCTCTGGAG  
ACAGCTCCCAGGTCACTCAAGTCAGTCCCAGAGGATTGCACTCCGGCTCCGGCCAGATGATTCAAGAATTTCTCC  
ATCCAAGTGCGGCAGGTGGAGGATTACCCTGTGGACATCTACTACTTGATGGACCTGTCTTACTCCATGAAGGATGA  
TCTGTGGAGCATCCAGAACCTGGGTACCAAGCTGGCCACCCAGATGCGAAAGCTCACCAGTAACCTGCGGATTGGCT  
TCGGGCATTTGTGGACAAGCCTGTGTACCATACATGTATATCTCCCCACCAGAGGCCCTCGAAAACCCCTGCTAT  
GATATGAAGACCACCTGCTTGCCCATGTTGGCTACAAAACACGTGCTGACGCTAACTGACCAGGTGACCCGCTTCAA  
TGAGGAAGTGAAGAAGCAGAGTGTGTACGGAACCGAGATGCCCCAGAGGGTGGCTTTGATGCCATCATGCAGGCTA  
CAGTCTGTGATGAAAAGATTGGCTGGAGGAATGATGCATCCCACTTGTGGTGTACCCTGATGCCAAGACTCAT  
ATAGCATTGGACGGAAGGCTGGCAGGCATTGTCCAGCCTAATGACGGGCAGTGTATGTTGGTAGTGACAATCATT

CTCTGCCTCCACTACCATGGATTATCCCTCTTTGGGGCTGATGACTGAGAAGCTATCCCAGAAAAACATCAATTTGA  
TCTTTGCAGTGACTGAAAATGTAGTCAATCTCTATCAGAACTATAGTGAGCTCATCCCAGGGACCACAGTTGGGGTT  
CTGTCCATGGATTCCAGCAATGTCTCCAGCTCATTGTTGATGCTTATGGGAAAATCCGTTCTAAAGTAGAGCTGGA  
AGTGCGTGACCTCCCTGAAGAGTTGTCTCTATCCTTCAATGCCACCTGCCTCAACAATGAGGTCATCCCTGGCCTCA  
AGTCTTGTATGGGACTCAAGATTGGAGACACGGTGAGCTTCAGCATTGAGGCCAAGGTGCGAGGCTGTCCCCAGGAG  
AAGGAGAAGTCCTTTACCATAAAGCCCGTGGGCTTCAAGGACAGCCTGATCGTCCAGGTCACCTTTGATTGTGACTG  
TGCCTGCCAGGCCAAGCTGAACCTAATAGCCATCGCTGCAACAATGGCAATGGGACCTTTGAGTGTGGGGTATGCC  
GTTGTGGGCCTGGCTGGCTGGGATCCCAGTGTGAGTGCTCAGAGGAGGACTATCGCCCTTCCCAGCAGGACGAATGC  
AGCCCCGGGAGGGTCAGCCCGTCTGCAGCCAGCGGGCGAGTGCCCTGTGGTCAATGTGTCTGCCACAGCAGTGA  
CTTTGGCAAGATCACGGGCAAGTACTGCGAGTGTGACGACTTCTCCTGTGTCCGCTACAAGGGGGAGATGTGCTCAG  
GCCATGGCCAGTGACGCTGTGGGGACTGCCTGTGTGACTCCGACTGGACCGGCTACTACTGCAACTGTACCACGCGT  
ACTGACACCTGCATGTCCAGCAATGGGCTGCTGTGCAGCGGCCGCGCAAGTGTGAATGTGGCAGCTGTGTCTGTAT  
CCAGCCGGGCTCCTATGGGGACACCTGTGAGAAGTGCCCCACCTGCCAGATGCCTGCACCTTTAAGAAAGAATGTG  
TGGAGTGTAAAGAAGTTTGACCGGGGAGCCCTACATGACGAAAATACCTGCAACCGTTACTGCCGTGACGAGATTGAG  
TCAGTGAAAGAGCTTAAGGACACTGGCAAGGATGCAGTGAATTGTACCTATAAGAATGAGGATGACTGTGTCTGTGAG  
ATTCCAGTACTATGAAGATTCTAGTGGAAAGTCCATCCTGTATGTGGTAGAAGAGCCAGAGTGTCCAAGGGCCCTG  
ACATCCTGGTGGTCTCTCAGTGATGGGGGCCATTCTGCTCATTGGCCTTGCCGCCCTGCTCATCTGGAAACTC  
CTCATCACCATCCACGACCGAAAAGAATTCGCTAAATTTGAGGAAGAACGCGCCAGAGCAAAATGGGACACAGCCAA  
CAACCCACTGTATAAAGAGGCCACGTCTACCTTACCAATATCACGTACCGGGGCACTTAA

GPIIb序列(3120 nt):

ATGGCCAGAGCTTTGTGTCCACTGCAAGCCCTCTGGCTTCTGGAGTGGGTGCTGCTGCTCTTGGGACCTTGTG  
CTGCCCCCTCCAGCCTGGGCCTTGAACCTGGACCCAGTGACGCTCACCTTCTATGCAGGCCCAATGGCAGCCAGTTT  
GGATTTTCACTGGACTTCCACAAGGACAGCCATGGGAGAGTGGCCATCGTGGTGGGCGCCCCGCGGACCCTGGGCCC  
CAGCCAGGAGGAGACGGGCGGCGTTCCTGTGCCCTGGAGGGCCGAGGGCGGCCAGTGCCCTCGCTGCTCTTTG  
ACCTCCGTGATGAGACCCGAAATGTAGGCTCCCAAACCTTACAAACCTTCAAGGCCCGCAAGGACTGGGGGCGTGC  
GTCGTGAGCTGGAGCGACGTCATTGTGGCCTGCGCCCCCTGGCAGCACTGGAACGTCCTAGAAAAGACTGAGGAGGC  
TGAGAAGACGCCCAGGTAGCTGCTTTTTGGCTCAGCCAGAGAGCGGCCCGCCGCGCCGAGTACTCCCCCTGTGCGG  
GGAACACCCTGAGCCGATTTACGTGGAATAATTTAGCTGGGACAAGCGTACTGTGAAGCGGGCTTCAGCTCC  
GTGGTCACTCAGGCCGAGAGCTGGTGCTTGGGGCTCCTGGCGGCTATTATTTCTTAGGTCTCCTGGCCCAGGCTCC  
AGTTGCGGATATTTTCTCGAGTTACCGCCAGGCATCCTTTTGTGGCACGTGTCTCCAGAGCCTCTCCTTTGACT  
CCAGCAACCCAGAGTACTTCGACGGTACTGGGGTACTCGGTGGCCGTGGGCGAGTTCGACGGGGATCTCAACACT  
ACAGAATATGTCGTCGGTGCCCCACTTGGAGCTGGACCCTGGGAGCGGTGGAATTTTGGATTCTACTACCAGAG  
GCTGCATCGGCTGCGCGGAGAGCAGATGGCGTCGATTTTGGGCATTAGTGGCTGTCACTGACGTCAACGGGGATG  
GGAGGCATGATCTGCTGGTGGGCGCTCCACTGTATATGGAGAGCCGGGCGAGCCGAAAACCTGGCCGAAGTGGGGCGT  
GTGTATTTGTTCTGACCGCGAGGCCCCACGCGCTGGGTGCCCCAGCCTCCTGCTGACTGGCACACAGCTCTA  
TGGGCGATTGCGCTCTGCCATCGCACCCCTGGGCGACCTCGACCGGGATGGCTACAATGACATTGCAGTGGCTGCCC  
CCTACGGGGTCCCAGTGGCCGGGGCCAAGTGTGGTGTTCCTGGGTGAGAGTGGGGCTGAGGTCACGTCCCTCC  
CAGGTCTGGACAGCCCTTCCCCACAGGCTCTGCCTTTGGCTTCTCCCTCGAGGTGCCGTAGACATCGATGACAA  
CGGATAACCAGACCTGATCGTGGGAGCTTACGGGGCCAACCAGGTGGCTGTGTACAGAGCTCAGCCAGTGGTGAAGG

CCTCTGTCCAGCTACTGGTGCAAGATTCACTGAATCCTGCTGTGAAGAGCTGTGTCCTACCTCAGACCAAGACACCC  
 GTGAGCTGCTTCAACATCCAGATGTGTGTTGGAGCCACTGGGCACAACATTCCTCAGAAGCTATCCCTAAATGCCGA  
 GCTGCAGCTGGACCGCAGAAGCCCCGCCAGGGCCGGCGGGTGTGCTGCTGCTGGGCTCTCAACAGGCAGGCACCACCC  
 TGAACCTGGATCTGGGCGGAAAGCACAGCCCCATCTGCCACACCACCATGGCCTTCCTTCGAGATGAGGCAGACTTC  
 CGGGACAAGCTGAGCCCCATTGTGCTCAGCCTCAATGTGTCCCTACCGCCACGGAGGCTGGAATGGCCCCTGTGT  
 CGTGCTGCATGGAGACACCCATGTGCAGGAGCAGACACGAATCGTCCTGGACTGTGGGGAAGATGACGTATGTGTGC  
 CCCAGCTTCAGCTCACTGCCAGCGTGACGGGCTCCCCGCTCCTAGTTGGGGCAGATAATGTCCTGGAGCTGCAGATG  
 GACGCAGCCAACGAGGGCGAGGGGGCCTATGAAGCAGAGCTGGCCGTGCACCTGCCCCAGGGCGCCACTACATGCG  
 GGCCCTAAGCAATGTCGAGGGCTTTGAGAGACTCATCTGTAATCAGAAGAAGGAGAATGAGACCAGGGTGGTGTGT  
 GTGAGCTGGGCAACCCCATGAAGAAGAACGCCAGATAGGAATCGCGATGTTGGTGAGCGTGGGGAATCTGGAAGAG  
 GCTGGGGAGTCTGTGTCCTTCAGCTGCAGATACGGAGCAAGAACAGCCAGAATCCAAACAGCAAGATTGTGCTGCT  
 GGACGTGCCGGTCCGGGCAGAGGCCAAGTGGAGCTGCGAGGGAACCTTTCCAGCCTCCCTGGTGGTGGCAGCAG  
 AAGAAGGTGAGAGGGAGCAGAACAGCTTGACAGCTGGGGACCCAAAGTGGAGCACACCTATGAGCTCCACAACAAT  
 GGCCCTGGGACTGTGAATGGTCTTCACCTCAGCATCCACCTCCGGGACAGTCCCAGCCCTCCGACCTGCTCTACAT  
 CCTGGATATACAGCCCCAGGGGGCCTTCAGTGCTTCCACAGCCTCCTGTCAACCCTCTCAAGGTGGACTGGGGGC  
 TGCCCATCCCCAGCCCTCCCCATTACCCGGCCCATCACAAGCGGGATCGCAGACAGATCTTCTGCCAGAGCCC  
 GAGCAGCCCTCGAGGCTTCAGGATCCAGTTCTCGTAAGTGTGACTCGGCGCCCTGTACTGTGGTGCAGTGTGACCT  
 GCAGGAGATGGCGCGGGCAGCGGGCCATGGTCACGGTGTGGCCTTCTGTGGCTGCCAGCCTCTACCAGAGGC  
 CTCTGGATCAGTTTGTGCTGCAGTCGCACGCATGGTTCAACGTGTCTCCCTCCCCTATGCGGTGCCCCCGCTCAGC  
 CTGCCCCGAGGGGAAGCTCAGGTGTGGACACAGCTGCTCCGGGCCTTGAGGAGAGGGCCATTCCAATCTGGTGGGT  
 GCTGGTGGGTGTGCTGGGTGGCCTGCTGCTGCTCACCATCCTGGTCCTGGCCATGTGGAAGGTGGGCTTCTTCAAGC  
 GGAACCGCCACCCCTGGAAGAAGATGATGAAGAGGGGGAGTGA

#### 细胞转染和筛选

CHO细胞培养：用含10%胎牛血清的IMDM培养基培养CHO细胞，取6孔培养板，以 $3 \times 10^4$ / $\text{cm}^2$ 密度铺板，37℃，5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养至80%汇合。

转染液制备：在EP管中制备以下两液（为转染每一个孔细胞所用的量）；A液用100 $\mu\text{L}$ 不含血清IMDM培养基稀释10 $\mu\text{g}$  DNA，B液用100 $\mu\text{L}$ 不含血清IMDM培养基稀释对应的转染试剂；将A液和B液按1:1混匀，室温静置15分钟。

转染准备：用2mL不含血清IMDM培养基将CHO细胞漂洗两次，再加入2mL不含血清及PS的IMDM培养基。

[0027] 转染：把A/B复合物缓缓加入培养液中（缓慢滴加），轻轻摇匀，37℃温箱置6小时，吸除无血清转染液，换入含有10%胎牛血清和PS的IMDM培养基继续培养。转染后48小时去掉旧培养基，加入含有G418（600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的IMDM培养基培养9天，每三天换液一次。挑选筛选后阳性克隆，置于新的培养瓶加入含有G418（400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的IMDM培养基继续培养，等细胞培养至80%汇合时消化下来，分别用抗GP Ib $\alpha$ 、GP Ib $\beta$ 、GP IX、GP IIb和GP IIIa抗体检测细胞表面相应蛋白表达情况。

[0028] 将pcDNA-GP Ib $\alpha$ 、pcDNA-GP Ib $\beta$  和pcDNA-GP IX三种重组质粒转染入CHO细胞，将成功转染上述三种质粒的细胞命名为CHO-IbIX；将pcDNA-GP IIb和pcDNA-GP IIIa两种重组质粒转染入CHO细胞，将成功转染上述两种质粒的细胞命名为CHO-IIbIIIa；将pcDNA-GP

Ib $\alpha$ 、pcDNA-GP Ib $\beta$ 、pcDNA-GP IX、pcDNA-GP IIb和pcDNA-GP IIIa转染入CHO细胞,将成功转染上述五种质粒的细胞命名为CHO-123。

#### [0029] 细胞分选与蛋白表达

将培养细胞用0.04%乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA2Na)10min,弃去消化液,加PBS液;用吸管将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来,并移入离心管中,800rpm,5 min;弃上清,加pH7.4的PBS液5ml,800rpm,5 min;重复3次,以去除细胞悬液中的细胞碎片;用PBS重悬细胞,调整细胞浓度至 $5 \times 10^6$ /ml,加入抗GP Ib-IX或GP IIb/IIIa抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育30 min,加入PBS液,800rpm,5 min,弃上清。加入PBS液将沉淀细胞轻轻吹打均匀,待分选。采用贝克曼库尔特MoFlo XDP 超速流式分选系统对表达阳性细胞进行分选和收集。分选后的细胞用含10%胎牛血清及PS的IMDM培养基进行培养。待细胞长至培养瓶中80%汇合消化下来进行下一次分选,总共分选8次,获得了稳定表达细胞株,阳性细胞株分选结果见附图2,采用流式细胞术分选稳定表达GP Ib-IX、GP IIb/IIIa的阳性细胞株,分选后蛋白表达率均达超过90%。

#### [0030] 稳定表达细胞株的保存

消化需要固定的细胞,800rpm/min离心5min,加入4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液,调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$ /ml,4 $^{\circ}$ C固定12h。PBS洗去固定液,加入含10%DMSO的PBS,置于-40 $^{\circ}$ C。分别与第12、22、45、90、180天时检测表达。检测前于37 $^{\circ}$ C恒温水浴锅快速解冻,洗去冻存液,用流式细胞仪测细胞表面蛋白的表达,阳性细胞株保存结果见附图3,GP Ib-IX和GP IIb/IIIa表达阳性的CHO细胞采用4%甲醛固定,-80 $^{\circ}$ C冻存180天,采用流式细胞术分析细胞表面特异性蛋白表达下降情况。

[0031] 选择固定后表达稳定的CHO-IbIX、CHO-IIbIIIa和CHO-123细胞与荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白多克隆抗体组成检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂;再结合PBS缓冲液、含DAPI的封片剂组成检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂盒。

#### [0032] 实施例二 血清中游离血小板表面特异性自身抗体检测

取出50  $\mu$ l固定后表达稳定的CHO-IbIX、CHO-IIbIIIa和CHO-123细胞,分别加入50  $\mu$ l预先稀释好的血清样本(用PBS稀释200倍),37 $^{\circ}$ C孵育1h;加入PBS,800rpm/min离心5min;弃上清,加入FITC-羊抗人IgG(荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白多克隆抗体),37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;加入PBS,800rpm/min离心5min;弃上清。

[0033] 采用荧光法如下操作:加入PBS重悬细胞,取10  $\mu$ l细胞悬液(含 $1 \times 10^4$ 个细胞)加入10 $\mu$ l含DAPI的封片剂,滴于玻片上,加盖玻片。在荧光显微镜下直接观察,若细胞膜显示绿色荧光,则为阳性,反之为阴性。

[0034] 图4为临床确诊为ITP病人的血清样本(采用间接免疫荧光法检测了ITP患者和正常人血清中抗GP Ib/IX、GP IIb-IIIa抗体水平)、正常人血清样本以及CHO细胞的荧光图,ITP病人上述抗体显示阳性,正常人和CHO细胞显示阴性;与临床检测符合率达90%以上。

[0035] 采用流式细胞术如下操作:细胞悬液中加入400  $\mu$ l PBS上机检测,根据同型对照调节补偿,若荧光强度超过临界值cut-off值则判定为阳性,反之为阴性;与临床检测符合率达90%以上。

[0036] 通过流式细胞术分析临床102例ITP病人和104例正常人血清中抗GP Ib-IX和抗GP IIb/IIIa抗体的水平,采用ROC曲线确定了该检测方法的曲线面积、cut-off值以及相应的特异性和敏感性;见附图5以及表1;图6为流式细胞学方法检测结果图。

[0037] 表1 ROC曲线表征结果

| 抗体类型           | 曲线面积 | 临界值  | 特异性  | 敏感性  |
|----------------|------|------|------|------|
| 抗IbIX          | 0.93 | 1.96 | 90.4 | 85.2 |
| 抗IIbIIIa       | 0.98 | 1.66 | 95.2 | 91.3 |
| 抗IbIX+抗IIbIIIa | 0.97 | 1.78 | 95.2 | 86.3 |

利用磁珠法进行验证,结果见表2。

[0038] 表2流式细胞学方法与临床符合率的比较

| 抗体类型            | 样本例数 | 阳性符合率        | 阴性符合率         | 总符合率           |
|-----------------|------|--------------|---------------|----------------|
| 抗IbIX           | 170  | 83.8 (55/66) | 90.4 (94/104) | 87.6 (149/170) |
| 抗IIbIIIa        | 185  | 92.6 (75/81) | 95.2 (99/104) | 94.1 (174/185) |
| 抗IbIX+抗IIb/IIIa | 202  | 86.7 (85/98) | 95.2 (99/104) | 91.1 (184/202) |

本发明采用基因重组和转染的方法促使CHO(中国地鼠卵巢细胞)表达人血小板特异性糖蛋白GP Ib/IX和/或GP IIb-IIIa。将特异性膜糖蛋白表达阳性CHO与待测血清共孵育,最后加入荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白多克隆抗体(二抗)结合。若血清中存在抗血小板特异性抗体则形成“CHO-膜糖蛋白特异性抗体-异硫氰酸荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白多克隆抗体”复合物结构,表现为CHO细胞绿色荧光强度增高或者荧光强度超过临界值。

## 序列表

&lt;110&gt; 苏州大学

&lt;120&gt; 检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 621

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial)

&lt;400&gt; 1

```

atgggctccg ggccgcgcgg ggcgctgagc ttactgctec tgctgctggc cccgccgagc 60
cgccccggccg caggttgccc ggcgcctgt agctgcgcgg ggacgctcgt ggactgcggg 120
cgccgcggggc tgacttgggc ctgctgccc accgccttc ctgtcgacac aaccgagctg 180
gtgctgaccg gcaacaacct gacggcgtg ccgccggggc tgctggacgc gctgccccgcg 240
ctgcgcaccg cacacctggg cgccaacccc tggcgctgcg actgccgct tgtgccgctg 300
cgcgctggc tggccggccg ccccgagcgt gcgccctacc gcgacctgcg ttgcgtggcg 360
ccccagcgc tcgcgggccg cctgctgccc tatctggccg aggacgagct gcgcccgcgt 420
tgcgctcccg gcccgtctg ctggggggcg ctggcggcgc agcttgcgct gctgggcctt 480
gggctgctgc acgcgttctg gctggtgctg ctgctgtgcc gcctgcggag gctgcgggcc 540
cgggccccgcg ctgcgcccgc agccccgctg tcgctgaccg acccgctggt ggccgagcga 600
gccggaaccg acgagtcctg a 621

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1959

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial)

&lt;400&gt; 2

```

atgcctctcc tcctcttctg gctcctgctg ccaagcccct tacacccccca ccccatctgt 60
gaggtctcca aagtggccag ccacctagaa gtgaactgtg acaagaggaa tctgacagcg 120
ctgcctccag acctgccgaa agacacaacc atctccacc tgagtgagaa cctcctgtac 180
accttctccc tggaaccct gatgccttac actgcctca ctcagctgaa cctagatagg 240
tgcgagctca ccaagctcca ggtcgatggg acgctgccag tgctggggac cctggatcta 300
tcccacaatc agctgcaaag cctgcccttg ctagggcaga cactgctgc tctaccgctc 360
ctggacgtct cttcaaccg gctgacctcg ctgctcttg gtgccctgcg tggctttggc 420
gaactccaag agctctacct gaaaggcaat gagctgaaga cctgcccc aggctcctg 480
acgcccacac ccaagctgga gaagctcagt ctggctaaca acaacttgac tgagctcccc 540
gctgggctcc tgaatgggct ggagaatctc gacacccttc tectccaaga gaactcgtg 600
tatacaatac caaagggett ttttgggtcc cacctcctgc cttttgcttt tctccacggg 660
aaccctggt tatgcaactg tgagatctc tattttcgtc gctggctgca ggacaatgct 720

```

gaaaatgtct acgtatggaa gcaaggtgtg gacgtcaagg ccatgacctc taacgtggcc 780  
 agtgtgcagt gtgacaattc agacaagttt cccgtctaca aatacccagg aaaggggtgc 840  
 cccacccttg gtgatgaagg tgacacagac ctatatgatt actaccaga agaggacact 900  
 gagggcgata aggtgcgtgc cacaaggact gtggtcaagt tccccaccaa agcccataca 960  
 accccctggg gtctattcta ctcatgttcc actgcttctc tagacagcca aatgccctcc 1020  
 tccttgcac ccaacacaaga atccactaag gagcagacca cattcccacc tagatggacc 1080  
 ccaaatattca cacttcacat ggaatccatc acattctcca aaactccaaa atccactact 1140  
 gaaccaaccc caagcccagc cacctcagag cccgtcccgg agcccgcccc aaacatgacc 1200  
 accctggagc ccaactccaag cccgaccacc ccagagccca cctcagagcc cgccccagc 1260  
 ccgaccaccc cggagcccac ctcagagccc gccccagcc cgaccacccc agagcccacc 1320  
 tcagagcccg cccccagccc gaccaccccg gageccacc caatcccagc catcgccaca 1380  
 agcccagcca tcctggtgtc tgccacaagc ctgateactc caaaaagcac atttttaact 1440  
 accacaaaac ccgtatcaact cttagaatcc accaaaaaaa ccatccctga acttgatcag 1500  
 ccaccaaagc tccgtggggg gctccaaggc catttggaga gctccagaaa tgaccctttt 1560  
 ctccaccccg acttttgetg cctcctcccc ctgggttct atgtcttggg tctcttctgg 1620  
 ctgctctttg cctctgtggt cctcatcctg ctgctgagct gggttgggca tgtgaaacca 1680  
 caggccctgg actctggcca aggtgctgct ctgaccacag ccacacaaac cacacacctg 1740  
 gagctgcaga ggggacggca agtgacagtg ccccggcct ggctgctctt ccttcgaggt 1800  
 tcgcttcca ctttccgctc cagcctcttc ctgtgggtac ggcctaatgg ccgtgtgggg 1860  
 cctctagtgg caggaaggag gccctcagct ctgagtcagg gtcgtggtca ggacctgctg 1920  
 agcacagtga gcattagta ctctggccac agcctctga 1959

<210> 3

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<400> 3

atgcctgcct ggggagccct gttcctgctc tgggccacag cagaggccac caaggactgc 60  
 cccagcccat gtacctgccg cgccctggaa accatggggc tgtgggtgga ctgcaggggc 120  
 cacggactca cgccctgcc tgccctgcc gcccgcacc gccaccttct gctggccaac 180  
 aacagccttc agtccgtgcc cccgggagcc tttgaccacc tgccccagct gcagaccctc 240  
 gatgtgacgc agaaccctg gcaactgtgac tgcagcctca cctatctgcg cctctggctg 300  
 gaggaccgca cgcccagagc cctgctgcag gtccgctgtg ccagccccag cctcgtctgc 360  
 catggccccg tgggccggct gacaggctac cagctgggca gctgtggctg gcagctgcag 420  
 gcgtcctggg tgcgcccggg ggtcttgtgg gacgtggcgc tggctgccct ggccgcgctg 480  
 ggccctggctc ttctggctgg cctgctgtgt gccaccacag aggcctgga ttga 534

<210> 4

<211> 2367

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

&lt;400&gt; 4

atgcgagcgc ggccgcggcc ccggccgctc tgggcgactg tgctggcgct gggggcgctg 60  
gcgggcgttg gcgtaggagg gcccaacatc tgtaccacgc gaggtgtgag ctctctgccag 120  
cagtgccctgg ctgtgagccc catgtgtgcc tggtgctctg atgaggccct gcctctgggc 180  
tcacctcgct gtgacctgaa ggagaatctg ctgaaggata actgtgcccc agaatccatc 240  
gagttcccag tgagtgaggc ccgagtacta gaggacaggc ccctcagcga caagggtctt 300  
ggagacagct cccaggtcac tcaagtcagt ccccagagga ttgactccg gctccggcca 360  
gatgattcga agaatttctc catccaagtg cggcaggtgg aggattacc cgtggacatc 420  
tactacttga tggacctgtc ttactccatg aaggatgatc tgtggagcat ccagaacctg 480  
ggtaccaagc tggccacca gatgcgaaag ctaccagta acctgcggat tggcttcggg 540  
gcatttgtgg acaagcctgt gtcaccatac atgtatatc ccccaccaga ggccctcgaa 600  
aaccctgct atgatatgaa gaccacctgc ttgccatgt ttggctacaa acacgtgctg 660  
acgctaactg accaggtgac ccgcttcaat gaggaagtga agaagcagag tgtgtcacgg 720  
aaccgagatg ccccagaggg tggtttgat gccatcatgc aggctacagt ctgtgatgaa 780  
aagattggct ggaggaatga tgcacccac ttgctggtgt ttaccactga tgccaagact 840  
catatagcat tggacggaag gctggcaggc attgtccagc ctaatgacgg gcagtgtcat 900  
gttggtagtg acaatcatta ctctgectc actaccatgg attatccctc tttggggctg 960  
atgactgaga agctatcca gaaaaacatc aatttgatct ttgcagtgac tgaaaatgta 1020  
gtcaatctct atcagaacta tagtgagctc atcccagga ccacagttgg ggttctgtcc 1080  
atggattcca gcaatgtcct ccagctcatt gttgatgctt atgggaaaat ccgttctaaa 1140  
gtagagctgg aagtgcgtga cctccctgaa gagttgtctc tatccttcaa tgccacctgc 1200  
ctcaacaatg aggtcatccc tggcctcaag tcttgatgg gactcaagat tggagacacg 1260  
gtgagcttca gcattgaggc caaggtgca ggctgtcccc aggagaagga gaagtccttt 1320  
accataaagc ccgtgggctt caaggacagc ctgatcgtcc aggtcacctt tgattgtgac 1380  
tgtgcctgcc aggcccaagc tgaacctaat agccatcgtc gcaacaatgg caatgggacc 1440  
tttgagtgtg gggatgccg ttgtgggctt ggctggctgg gatcccagtg tgagtgtca 1500  
gaggaggact atcgccctc ccagcaggac gaatgcagcc cccgggaggg tcagcccgtc 1560  
tgcagccagc ggggcgagtg cctctgtggt caatgtgtct gccacagcag tgactttggc 1620  
aagatcacgg gcaagtactg cgagtgtgac gacttctct gtgtccgcta caagggggag 1680  
atgtgctcag gccatggcca gtgcagctgt ggggactgcc tgtgtgactc cgactggacc 1740  
ggctactact gcaactgtac cacgcgtact gacacctgca tgtccagcaa tgggctgctg 1800  
tgcagcggcc gcggcaagtg tgaatgtggc agctgtgtct gtatccagcc gggctcctat 1860  
ggggacacct gtgagaagtg ccccacctgc ccagatgctt gcacctttaa gaaagaatgt 1920  
gtggagtgtg agaagtttga ccggggagcc ctacatgacg aaaatacctg caaccgttac 1980  
tgccgtgacg agattgagtc agtgaaagag ctttaaggaca ctggcaagga tgcagtgaat 2040  
tgtacctata agaatgagga tgactgtgtc gtcagattcc agtactatga agattctagt 2100  
ggaaagtcca tcctgtatgt ggtagaagag ccagagtgtc ccaaggccc tgacatcctg 2160  
gtggctctgc tctcagtgat gggggccatt ctgctcattg gccttgccgc cctgctcatc 2220  
tggaaactcc tcatcaccat ccacgaccga aaagaattcg ctaaatttga ggaagaacgc 2280

gccagagcaa aatgggacac agccaacaac ccaactgtata aagaggccac gtctaccttc 2340  
 accaatatca cgtaccgggg cacttaa 2367  
 <210> 5  
 <211> 3120  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial)  
 <400> 5  
 atggccagag ctttgtgtcc actgcaagcc ctctggcttc tggagtgggt gctgctgctc 60  
 ttgggacctt gtgctgcccc tccagcctgg gccttgaacc tggaccaggt gcagctcacc 120  
 ttctatgcag gccccaatgg cagccagttt ggattttcac tggacttcca caaggacagc 180  
 catgggagag tggccatcgt ggtggggcgcc ccgcggacc tgggccccag ccaggaggag 240  
 acgggcggcg tgttctgtg cccttggagg gccgagggcg gccagtgcc ctcgctgctc 300  
 tttgacctcc gtgatgagac ccgaaatgta ggctcccaa ctttacaac cttcaaggcc 360  
 cgccaaggac tgggggctc ggtcgtcagc tggagcgac tcattgtggc ctgcgcccc 420  
 tggcagcact ggaacgtcct agaaaagact gaggaggctg agaagacgcc cgtaggtagc 480  
 tgctttttgg ctcagccaga gagcggccgc cgcgccgagt actccccctg tcgcgggaac 540  
 accctgagcc gcatttacgt ggaaaatgat tttagctggg acaagcgta ctgtgaagcg 600  
 ggcttcagct ccgtggtcac tcaggccgga gagctggtgc ttggggctcc tggcggctat 660  
 tatttcttag gtctcttggc ccaggctcca gttgcggata ttttctcgag ttaccgcca 720  
 ggcatccttt tgtggcacgt gtctcccag agcctctct ttgactccag caaccagag 780  
 tacttcgacg gctactgggg gtactcgggt gccctggggc agttcgacgg ggatctcaac 840  
 actacagaat atgtcgtcgg tgccccact tggagctgga ccctgggagc ggtggaatt 900  
 ttggattcct actaccagag gctgcatcgg ctgcgcggag agcagatggc gtcgtat 960  
 gggcattcag tggctgtcac tgacgtcaac ggggatggga ggcatgatct gctggtgggc 1020  
 gctccactgt atatggagag ccgggcagac cgaaaactgg ccgaagtggg gcgtgtgtat 1080  
 ttgttcttgc agccgcgagg cccccacgcg ctgggtgcc ccagcctcct gctgactggc 1140  
 acacagctct atgggcgatt cggtctgcc atcgcaccc tgggcgacct cgaccgggat 1200  
 ggctacaatg acattgcagt ggctgcccc tacgggggtc ccagtggccg gggccaagt 1260  
 ctggtgttcc tgggtcagag tgaggggctg aggtcacgtc cctcccaggt cctggacagc 1320  
 cccttccccca caggctctgc ctttggcttc tccttcgag gtgccgtaga catcgatgac 1380  
 aacggatacc cagacctgat cgtgggagct tacggggcca accaggtggc tgtgtacaga 1440  
 gctcagccag tggatgaagg ctctgtccag ctactggtgc aagattcact gaatcctgct 1500  
 gtgaagagct gtgtcctacc tcagaccaag acaccctga gctgcttcaa catccagatg 1560  
 tgtgttggag ccaactggca caacattcct cagaagctat ccctaaatgc cgagctgcag 1620  
 ctggaccggc agaagccccg ccagggccgg cgggtgctgc tgctgggctc tcaacaggca 1680  
 ggcaccacc tgaacctgga tctgggcgga aagcacagcc ccacttcca caccacctg 1740  
 gccttccttc gagatgagge agacttccgg gacaagctga gccccattgt gctcagcctc 1800  
 aatgtgtccc taccgccac ggaggctgga atggcccctg ctgtcgtgct gcatggagac 1860  
 acccatgtgc aggagcagac acgaatcgtc ctggactgtg gggaagatga cgtatgtgtg 1920

ccccagcttc agctcactgc cagcgtgacg ggctccccgc tcctagttgg ggcagataat 1980  
gtcctggagc tgcagatgga cgcagccaac gagggcgagg gggcctatga agcagagctg 2040  
gccgtgcacc tgccccaggg cgcccactac atgcgggccc taagcaatgt cgagggcttt 2100  
gagagactca tctgtaatca gaagaaggag aatgagacca gggtggtgct gtgtgagctg 2160  
ggcaacccca tgaagaagaa cgcccagata ggaatcgca tgttggtgag cgtggggaat 2220  
ctggaagagg ctggggagtc tgtgtccttc cagctgcaga tacggagcaa gaacagccag 2280  
aatccaaaca gcaagattgt gctgctggac gtgccggtcc gggcagaggc ccaagtggag 2340  
ctgcgaggga actcctttcc agcctcctg gtggtggcag cagaagaagg tgagagggag 2400  
cagaacagct tggacagctg gggacccaaa gtggagcaca cctatgagct ccacaacaat 2460  
ggccctggga ctgtgaatgg tcttcacctc agcatccacc ttccgggaca gtcccagccc 2520  
tccgacctgc tctacatcct ggatatacag ccccaggggg gccttcagtg ctteccacag 2580  
cctcctgtca accctetcaa ggtggactgg gggtgceca tccccagccc ctccccatt 2640  
caccggccc atcacaagcg ggatcgaga cagatcttc tgccagagcc cgagcagccc 2700  
tcgaggcttc aggatccagt tctcgtaagc tgcgactcgg cgccctgtac tgtggtgcag 2760  
tgtgacctgc aggagatggc gcgcgggcag cgggcatgg tcacggtgct ggccttctg 2820  
tggtgceca gcctctacca gaggcctctg gatcagtttg tgctgcagtc gcacgcatgg 2880  
ttcaacgtgt cctccctccc ctatgcggtg cccccgctca gctgccccg aggggaagct 2940  
caggtgtgga cacagctgct ccgggccttg gaggagaggg ccattccaat ctggtgggtg 3000  
ctggtgggtg tgctgggtgg cctgctgctg ctcacatcc tggctctggc catgtggaag 3060  
gtcggcttct tcaagcggaa ccggccacc ctggaagaag atgatgaaga gggggagtga 3120

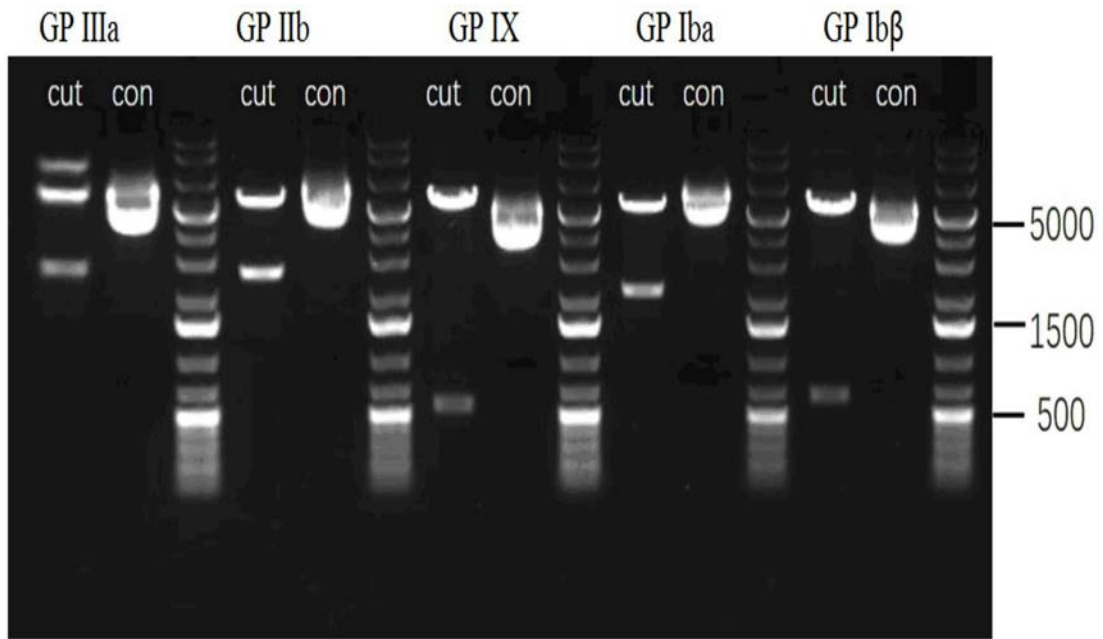


图1

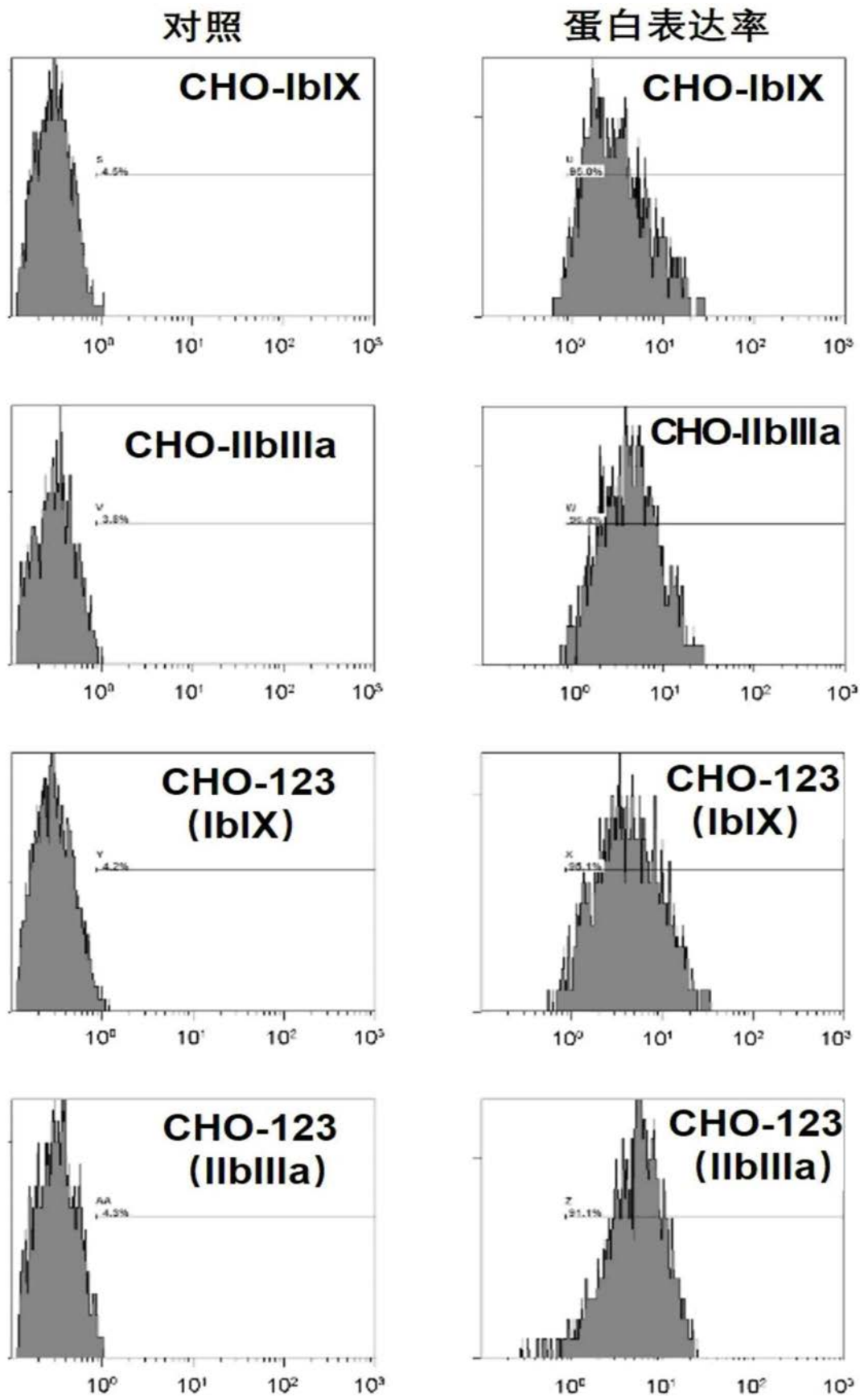


图2

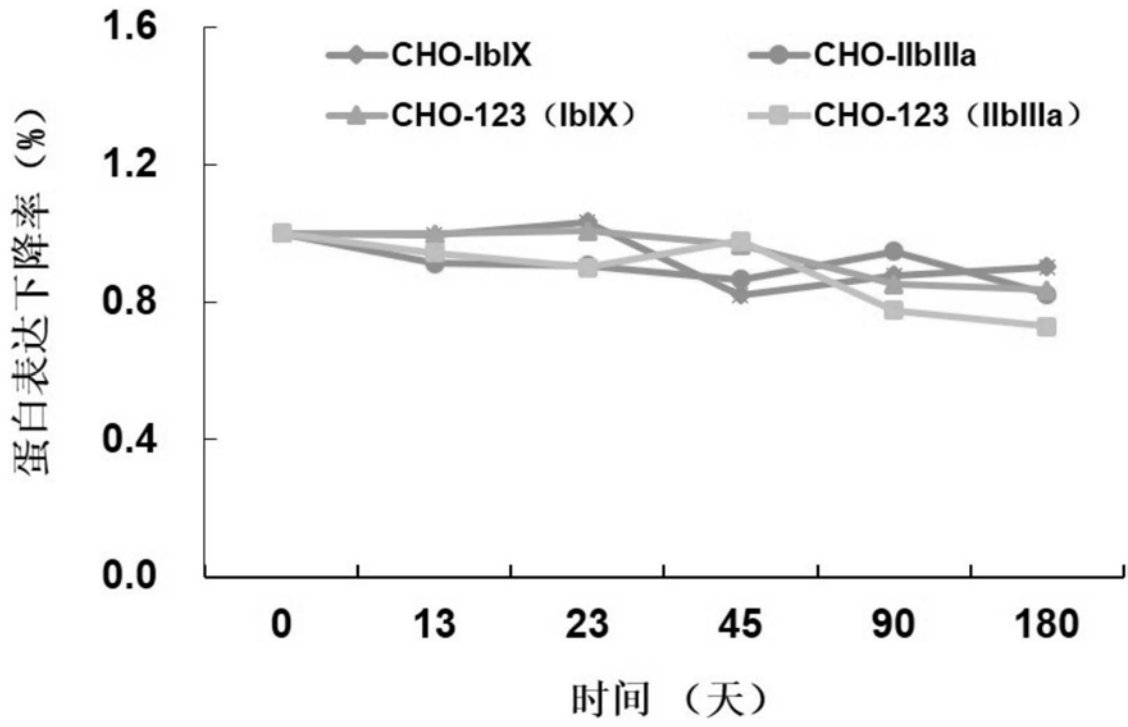


图3

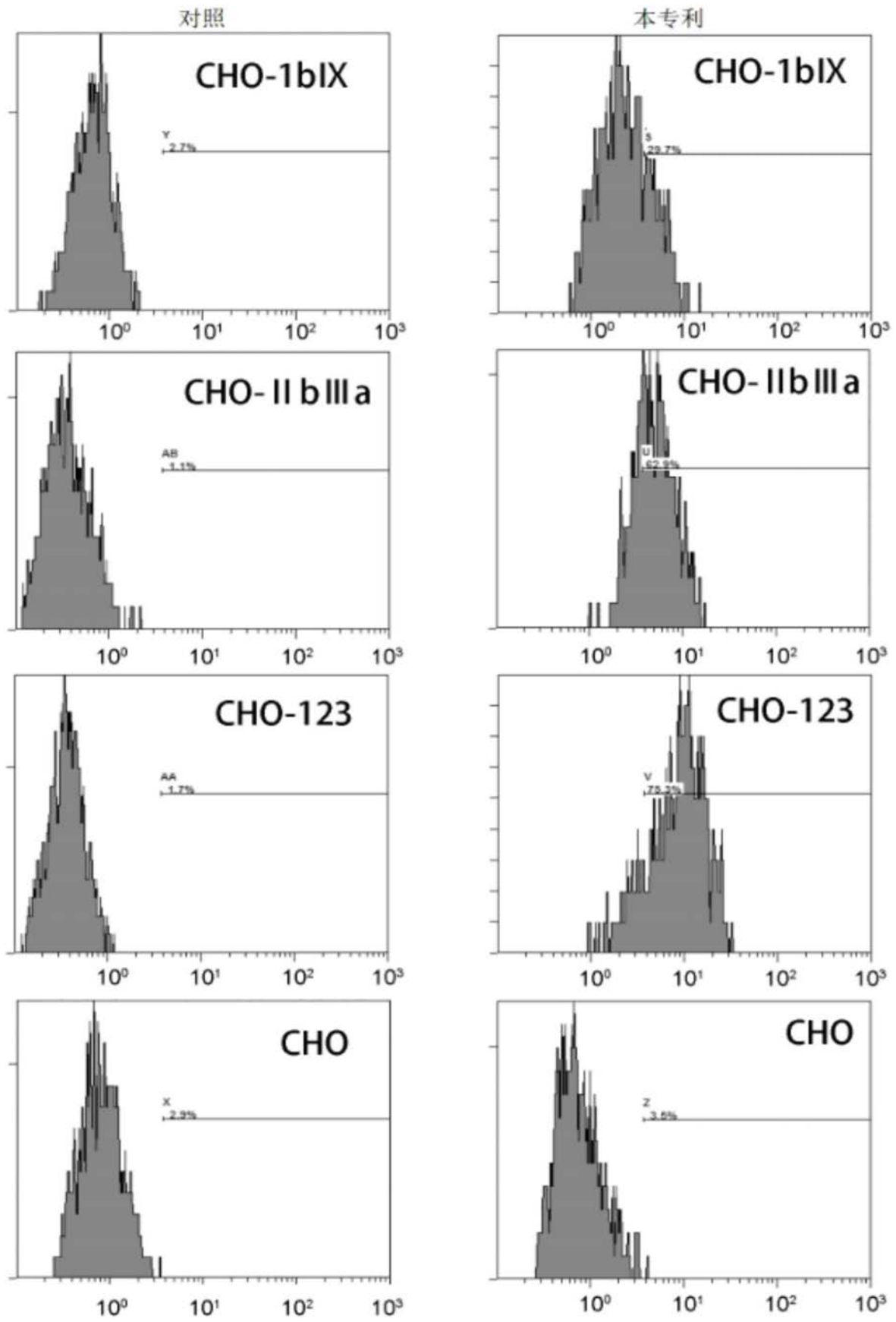


图4

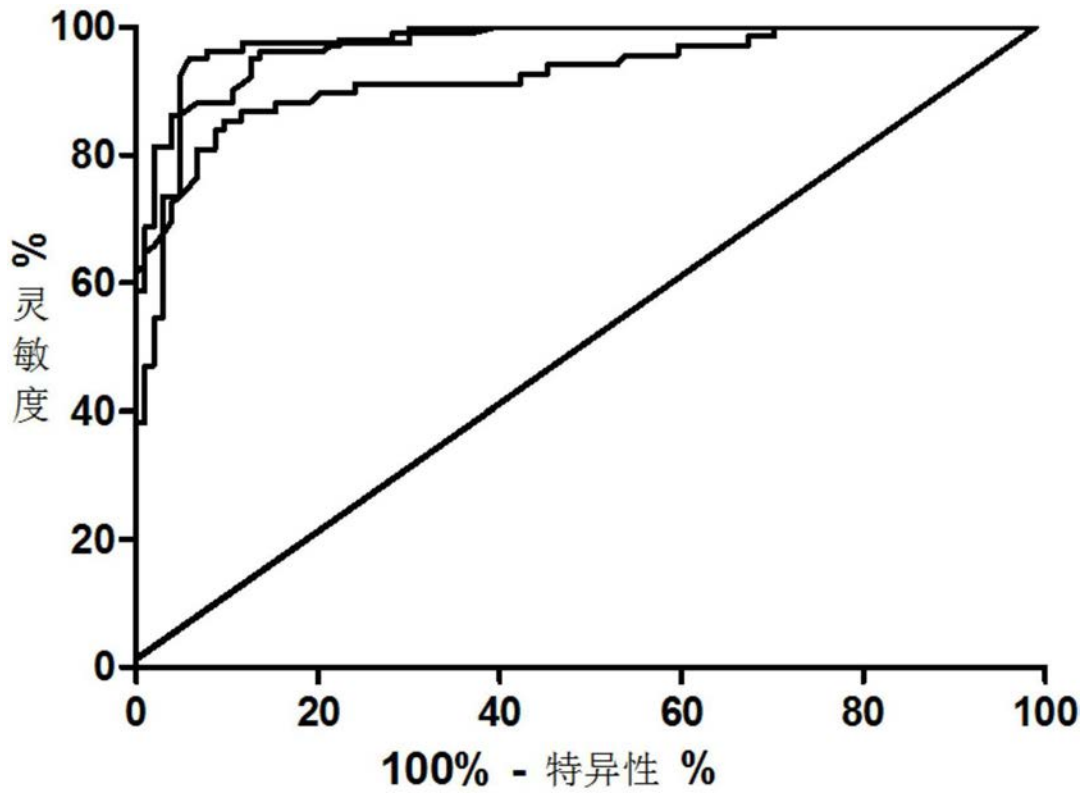


图5

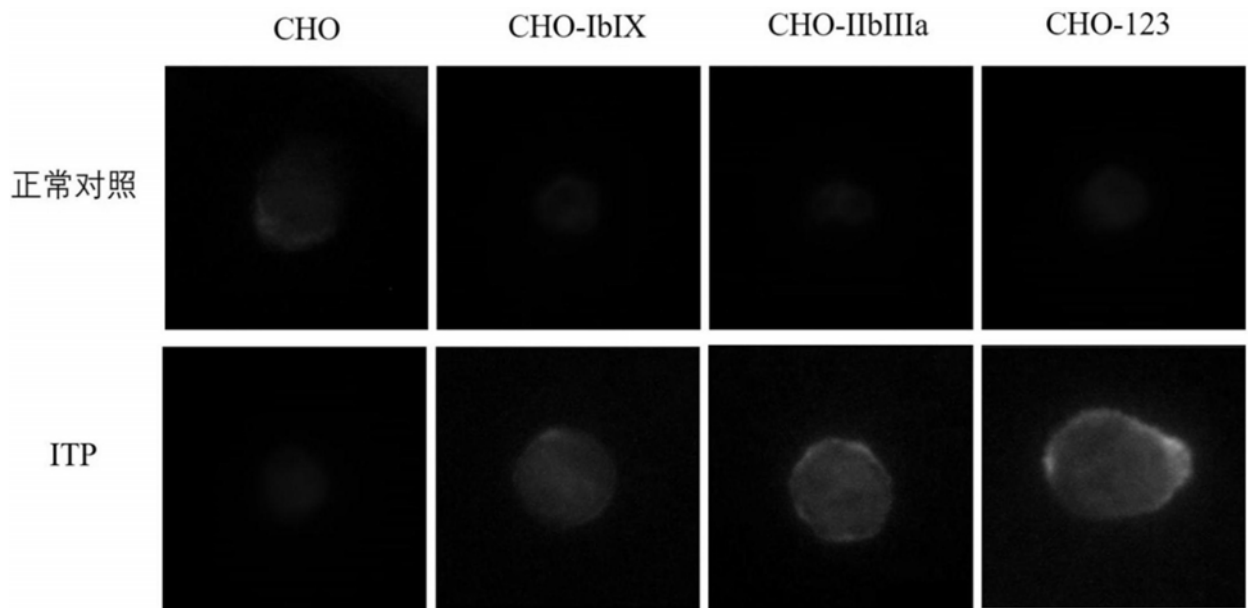


图6

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN107727843A</a>                   | 公开(公告)日 | 2018-02-23 |
| 申请号            | CN2017110949437.3                              | 申请日     | 2017-10-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 苏州大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 苏州大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 苏州大学   |         |            |
| [标]发明人         | 戴克胜  |         |            |
| 发明人            | 戴克胜  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/533 G01N33/68                           |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/533 G01N33/6893 G01N2800/222            |         |            |
| 代理人(译)         | 陶海锋  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了检测抗血小板表面受体特异性自身抗体的试剂及其制备方法与应用，具有较高的特异性和敏感性；采用基因重组和转染的方法使CHO细胞表达人血小板特异性受体膜糖蛋白GP Ib-IX和/或GP IIb/IIIa受体，将特异性膜糖蛋白受体表达阳性的CHO细胞与待测血清共孵育，最后加入荧光素标记的抗人免疫球蛋白多克隆抗体（二抗）结合。若血清或血浆中存在抗血小板受体特异性抗体则形成“CHO-膜糖蛋白特异性抗体-荧光素标记的抗人免疫球蛋白多克隆抗体”复合物结构，表现为CHO细胞荧光强度增高，可用流式细胞仪或荧光显微镜检测。本方法操作简便、特异性膜糖蛋白表达阳性CHO细胞来源充足、特异性和敏感性高、诊断效率高，可应用于基础研究和临床检测。

