



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103713121 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201310737092. 7

(22) 申请日 2013. 12. 23

(71) 申请人 天津瑞华生物科技有限公司

地址 300457 天津市滨海新区天津经济技术开发区洞庭路 220 号天津国际生物医药联合研究院 S1404

(72) 发明人 杨武 宁义刚

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

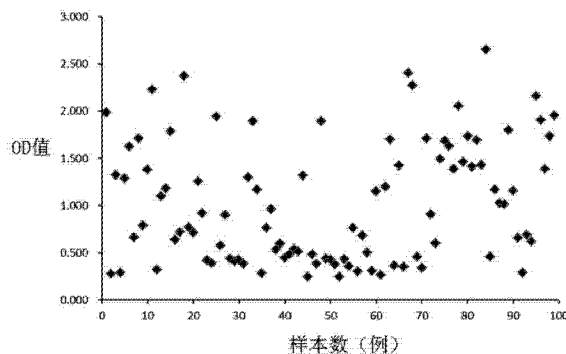
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

人血管炎诊断试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人血管炎诊断试剂盒及其制备方法,属于医学实验诊断技术领域。人血管炎诊断试剂盒,包括:(1)待检测血清标识物的标准品;(2)包被有识别标识物特异抗原系统的固相板;(3)连接有辣根过氧化酶的标识物的抗体;(4)洗涤液;(5)辣根过氧化酶底物的溶液;(6)终止液。本发明的优点是:方法灵敏,准确,重复性好,反应快速,无同位素污染;所组成的试剂盒性能稳定,操作简便,适于临床推广应用。



1. 人血管炎诊断试剂盒,其特征是包括:

- (1) 待检测血清标识物的标准品;
- (2) 包被有识别标识物特异抗原系统的固相板;
- (3) 联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体;
- (4) 洗涤液;
- (5) 辣根过氧化酶底物的溶液;
- (6) 终止液。

2. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述(1)待检测血清标识物的标准品为抗人 PR3 和 MPO 抗原免疫球蛋白 G。

3. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述(2)包被有识别标识物特异抗原系统的固相板为包被人粒细胞的固相板、包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板。

4. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述(3)联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体为抗非人类免疫球蛋白 G 抗体。

5. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述(4)洗涤液为磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述的(5)辣根过氧化酶底物的溶液包含 A 液和 B 液,其中 A 液为过氧化氢溶液, B 液为四甲基联苯胺溶液,或者 A 液为四甲基联苯胺, B 液为醋酸钠 / 枸橼酸缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述(6)终止液为 2M 硫酸。

8. 根据权利要求1所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述(1)待检测血清标识物的标准品的制备方法为:由高效价抗人 PR3 和 MPO 的血清中制备免疫球蛋白 G 抗血清,提纯 IgG,经 QAE 化学试剂处理血清并分离血清,将高效价的抗 PR3 和 MPO 的免疫球蛋白 G 血清混合制备,灭活补体,再加稳定剂处理,对所获样品用电泳法做纯度检测,计算纯度。

9. 根据权利要求3所述的人血管炎诊断试剂盒,其特征是:所述的包被人粒细胞的固相板的制备方法为:包括进行粒细胞提取,计算细胞纯度和活性检测,细胞包被步骤,其细胞包被的方法为用 $1 \times$ Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 稀释粒细胞,使其至终浓度约为 $100-1000000$ cells/mL,然后将悬液加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 100μ L,静置于室温,去上清,室温干燥,后用冷甲醇固定并干燥,用封盖膜将固定细胞的微孔板封盖,放置 20°C 保存备用;所述包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板的制备方法是:以 0.05M 磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液,包被抗原的浓度为 $0.04-1.0$ 微克/ml,包被溶液在微孔板的孔中 4°C , 24 小时,用去离子水洗涤两次,2% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 小时后,在温度为 $20-28^{\circ}\text{C}$ 及湿度小于或等于 30% 的条件下干燥 12 小时,然后装袋封口,储存于 4°C 待用。

10. 一种人血管炎诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:

所述的试剂盒包括:

- (1) 待检测血清标识物的标准品;
- (2) 包被有标识物特异抗原系统的固相板:包括包被人粒细胞的固相板、包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板;

- (3) 联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体；
- (4) 洗涤液；
- (5) 辣根过氧化酶底物的溶液；
- (6) 终止液；

所述的待检测血清标识物的标准品的制备方法为：由高效价抗人 PR3 和 MPO 的血清中制备免疫球蛋白 G 抗血清，提纯 IgG，经 QAE 化学试剂处理血清并分离血清，将高效价的抗 PR3 和 MPO 的免疫球蛋白 G 血清混合制备，灭活补体，再加稳定剂处理，然后对所获样品用电泳法做纯度检测，计算纯度；

所述的包被入粒细胞的固相板的制备方法为：包括进行粒细胞提取，计算细胞纯度和活性检测，细胞包被步骤，其细胞包被的方法为用 $1 \times$ Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 稀释粒细胞，使其至终浓度约为 $100-1000000$ cells/mL，然后将悬液加入到 96 孔细胞培养板中，每孔 $100 \mu\text{L}$ ，静置于室温，去上清，室温干燥，后用冷甲醇固定并干燥，用封盖膜将固定细胞的微孔板封盖，放置 20°C 保存备用；所述包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板的制备方法是：以 0.05M 磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液，包被抗原的浓度为 $0.04-1.0$ 微克 /ml，包被溶液在微孔板的孔中 4°C ，24 小时，用去离子水洗涤两次，2% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 小时 后，在温度为 $20-28^{\circ}\text{C}$ 及湿度小于或等于 30% 的条件下干燥 12 小时，然后装袋封口，储存于 4°C 待用；

所述的辣根过氧化酶连接抗体的采用碘酸钠法制备；

所述的辣根过氧化酶底物的溶液包含 A 液和 B 液，其中 A 液为过氧化氢溶液，B 液为四甲基联苯胺溶液或者 A 液为四甲基联苯胺；B 液为醋酸钠 / 枸橼酸缓冲液；

所述的终止液为 2M 硫酸，洗涤液为磷酸盐缓冲液。

人血管炎诊断试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人血管炎诊断试剂盒及其制备方法,属于医学实验诊断技术领域。

背景技术

[0002] 系统性血管炎(systemic vasculitis)是一组以血管坏死和炎症为主要病理改变的疾病,临床表现因受累血管的类型、大小、部位及病理特点不同而表现各异。常见的血管炎有魏格纳氏肉芽肿、显微镜下血管炎、肺出血-肾炎综合征和结节性多动脉炎等。其常累及全身多个系统,既可以引起多系统多脏器功能障碍,但也可局限于某一脏器。临床上主要表现为不明原因的腹泻,以及发烧,腹痛,直肠出血等。随着病情的发展,有些病人还出现不同程度的肠道外症状,如肝脏方面的疾患,关节炎,皮肤和眼睛方面的症状。由于其临床表现复杂,病情偏重,早期诊治困难,致残率、病死率高,预后差,因此,该疾病的早期诊断、治疗非常重要。

[0003] 特征性的抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)是一种以中性粒细胞和单核细胞胞质成分为靶抗原的自身抗体,包括了大量的自身抗体,其中抗蛋白酶3(PR3)抗体和抗髓过氧化物酶(MPO)抗体具有明确的临床诊断意义,是最重要的ANCA抗体。研究已经证实抗PR3和抗MPO抗体参与了血管炎的发病机制,两种抗体可以激活人中性粒细胞并致脱颗粒反应,使中性粒细胞释放大量有害的蛋白水解酶和氧自由基,从而导致小血管壁的伤害,造成血管炎的发生。

[0004] 目前临床检测系统性血管炎时,采用ELISA法测定抗PR3抗体和抗MPO抗体,并采用间接免疫荧光法(IIF法)检测ANCA。IIF法测ANCA时多采用乙醇固定中性粒细胞的抗原片进行,容易受到样本中抗核抗体(ANA)的影响,ANA会在乙醇固定片上出现难与ANCA区别的荧光颗粒,当患者的ANA呈强阳性时尤其明显,会产生干扰实验结果的判断。

发明内容

[0005] 本发明要解决的第一个技术问题是提供一种人血管炎诊断试剂盒,该试剂盒能够排除ANA干扰,并且实现抗PR3抗体和抗MPO抗体的定量检测。

[0006] 本发明要解决的第二个技术问题是提供上述试剂盒的制备方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 人血管炎诊断试剂盒,组成包括:

[0009] (1)待检测血清标识物的标准品;

[0010] (2)包被有识别标识物特异抗原系统的固相板;

[0011] (3)联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体;

[0012] (4)洗涤液;

[0013] (5)辣根过氧化酶底物的溶液;

[0014] (6)终止液。

[0015] 所述(1)待检测血清标识物的标准品为抗人 PR3 和 MPO 抗原免疫球蛋白 G。

[0016] 所述(2)包被有识别标识物特异抗原系统的固相板包括:包被人粒细胞的固相板、包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板;

[0017] 所述(3)联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体为抗非人类免疫球蛋白 G 抗体。

[0018] 所述(4)洗涤液为磷酸盐缓冲液。

[0019] 所述的(5)辣根过氧化酶底物的溶液包含 A 液和 B 液,其中 A 液为过氧化氢溶液, B 液为四甲基联苯胺溶液,或者 A 液为四甲基联苯胺, B 液为醋酸钠 / 枸橼酸缓冲液。

[0020] 所述(6)终止液为 2M 硫酸。

[0021] 所述(1)待检测血清标识物的标准品的制备方法为:由高效价抗人 PR3 和 MPO 的血清中制备免疫球蛋白 G 抗血清,提纯 IgG,经 QAE 化学试剂处理血清并分离血清,将高效价的抗 PR3 和 MPO 的免疫球蛋白 G 血清混合制备,灭活补体,再加稳定剂处理,对所获样品用电泳法做纯度检测,计算纯度。

[0022] 所述的包被人粒细胞的固相板的制备方法为:包括进行粒细胞提取,计算细胞纯度和活性检测,细胞包被步骤,其细胞包被的方法为用 $1 \times$ Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 稀释粒细胞,使其至终浓度约为 $100-1000000$ cells/mL,然后将悬液加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 100μ L,静置于室温,去上清,室温干燥,后用冷甲醇固定并干燥,用封盖膜将固定细胞的微孔板封盖,放置 20°C 保存备用;所述包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板的制备方法是:以 0.05M 磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液,包被抗原的浓度为 $0.04-1.0$ 微克 /ml,包被溶液在微孔板的孔中 4°C , 24 小时,用去离子水洗涤两次,2% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 小时后,在温度为 $20-28^{\circ}\text{C}$ 及湿度小于或等于 30% 的条件下干燥 12 小时,然后装袋封口,储存于 4°C 待用。

[0023] 一种人血管炎诊断试剂盒的制备方法,试剂盒包括:

[0024] (1)待检测血清标识物的标准品;

[0025] (2)包被有标识物特异抗原系统的固相板:包括包被人粒细胞的固相板、包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板;

[0026] (3)联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体;

[0027] (4)洗涤液;

[0028] (5)辣根过氧化酶底物的溶液;

[0029] (6)终止液;

[0030] 所述的待检测血清标识物的标准品的制备方法为:由高效价抗人 PR3 和 MPO 的血清中制备免疫球蛋白 G 抗血清,提纯 IgG,经 QAE 化学试剂处理血清并分离血清,将高效价的抗 PR3 和 MPO 的免疫球蛋白 G 血清混合制备,灭活补体,再加稳定剂处理,然后对所获样品用电泳法做纯度检测,计算纯度。

[0031] 所述的包被人粒细胞的固相板的制备方法为:包括进行粒细胞提取,计算细胞纯度和活性检测,细胞包被步骤,其细胞包被的方法为用 $1 \times$ Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 稀释粒细胞,使其至终浓度约为 $100-1000000$ cells/mL,然后将悬液加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 100μ L,静置于室温,去上清,室温干燥,后用冷甲醇固定并干燥,用封盖膜将固定细胞的微孔板封盖,放置 20°C 保存备用;所述包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板的制备方法是:以 0.05M 磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液,

包被抗原的浓度为 0.04-1.0 微克 /ml,包被溶液在微孔板的孔中 4℃,24 小时,用去离子水洗涤两次,2% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 小时后,在温度为 20-28℃及湿度小于或等于 30% 的条件下干燥 12 小时,然后装袋封口,储存于 4℃待用;

[0032] 所述的辣根过氧化酶连接抗体的采用碘酸钠法制备;

[0033] 所述的辣根过氧化酶底物的溶液包含 A 液和 B 液,其中 A 液为过氧化氢溶液,B 液为四甲基联苯胺溶液或者 A 液为四甲基联苯胺 ;B 液为醋酸钠 / 枸橼酸缓冲液;

[0034] 所述的终止液为硫酸,洗涤液为磷酸盐缓冲液。

[0035] 本发明提供了一种检测对血管炎特异的血清标识物的免疫分析测定方法和依据该方法制备的检验试剂盒,(1)测定内容的独特性和专有性:目前在中国所要检测的全部标识物都属创新产品,而针对标识物所开发的血管炎体外诊断试剂也是目前中国体外诊断试剂市场中在血管炎方面唯一的产品。(2)测定试剂盒的灵敏度高、特异性强、重复性好,测定结果可靠性强。可以在血清反应很低时或者在疾病发生发展的早期阶段测到待测物。与其他一些非特异炎症测试方法不同,本测试方法能够可靠地检测血管炎特有的血清标识物。(3)测定试剂盒的临床应用价值:对血管炎标识物的检测技术包含了对标识物的检测以及在测定过程中结合免疫荧光技术可以鉴别靶抗原的类型。这些检测结果可协助医生对血管炎的诊断,同时这些结果对治疗预后和治疗监控也提供了重要的参考价值。

[0036] 本发明与现有技术相比,具有如下优点和有益效果:本发明试剂盒采用微孔板为固相载体,通过免疫反应将血管炎特异的血清标识物与固定到微孔板上的特异抗原系统结合,然后与特异识别标识物的免疫球蛋白-辣根过氧化物酶结合,在所联酶对底物的酶促反应下使底物呈现颜色改变来定量测定血管炎特异的血清标识物。本发明采用甲醇固定粒细胞检测板,排除了患者血液样本中 ANA 的干扰,同时,本试剂盒能够实现定量测定抗 PR3 抗体和抗 MPO 抗体。本测定方法灵敏,准确,重复性好,反应快速,无同位素污染;所组成的试剂盒性能稳定,操作简便,适于临床推广应用。

[0037] 以下结合说明书附图和具体实施方式详细说明本发明,并不以此限定本发明的实施范围。

附图说明

[0038] 图 1 为标识物的标准曲线

[0039] 图 2 为检测检测 99 例血管炎病人血清的 OD 值分布

具体实施方式

[0040] 实施例 1:人血管炎诊断试剂盒

[0041] 一. 试剂盒组成:

[0042] (1) 待检测血清标识物的标准品:抗人 PR3 和 MPO 抗原免疫球蛋白 G。

[0043] (2) 包被有识别标识物特异抗原系统的固相板:包括包被人粒细胞的固相板、包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板;

[0044] (3) 联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体:联接有辣根过氧化酶的羊抗人 IgG 抗体(羊抗人 IgG 抗体,美国 ImmunoReagents Inc)

[0045] (4) 洗涤液:磷酸盐缓冲液;

[0046] (5)辣根过氧化酶底物的溶液:包含 A 液和 B 液,其中 A 液为过氧化氢溶液,B 液为四甲基联苯胺溶液,或者 A 液为四甲基联苯胺,B 液为醋酸钠 / 枸橼酸缓冲液;

[0047] (6)终止液:硫酸。

[0048] 二. 试剂制法:

[0049] (1)待检测血清标识物的标准品的制备

[0050] 用通过免疫荧光抗人 PR3 和 MPO 抗体靶抗原特异的检测系统确证的具有高效价抗人 PR3 和 MPO 的血清中制备免疫球蛋白 G 抗血清。

[0051] 取 QAE-SephadexA25 或 A50 经酸处理并在 0.05mol/LpH7.5 的磷酸盐缓冲液中平衡,将水分抽干,称湿重 1g 加于 10ml 血清中,在室温 30min 后,离心或过滤除去离子交换剂。上清液再如此处理一次,即获得较纯的 IgG。经 QAE 化学试剂处理血清并分离后,将高效价的抗 PR3 和 MPO 的免疫球蛋白 G 血清混合制备,置于 56℃ 水温箱 30min,灭活补体,再加 ProClin300 做稳定剂处理,然后对所获样品用电泳法做纯度检测,通过电泳凝胶上 IgG 条带位置与 mark 条带对比,分析确定其分子量大小,计算其制备的纯度。

[0052] 附图 1 为对包被粒细胞的固相板做的阳性血清的标准曲线。本方法对阳性标准品梯度稀释后,用专业数据处理软件得到的标准曲线,其 R 值可以达到 0.999,线性关系良好。待检病人血清经本方法检测获取吸光度值以后,通过本标曲拟合公式或矩阵图换算,可以得到病人血清内含有待检抗体的含量。

[0053] (2)包被有标识物特异抗原系统的固相微孔板的制备

[0054] A. 提取粒细胞:从健康供血者抽取新鲜的外周血到加有抗凝剂的抽血管中备用;将采集的全血用不含内毒素、钙、镁离子的 HBSS 按比例稀释;稀释后的全血加入含 Ficoll-paque plus 溶液层的上面,离心后,取出外周血单核细胞,并在 HBSS 缓冲液轻轻重悬,备用;迅速将细胞与葡聚糖轻轻混合,沉降并收集中性粒细胞。再用 HBSS 混,20℃ 离心。按全血量一定比例加入细胞溶解液,用细胞裂解液体积的 HBSS 缓冲液终止溶解反应,4℃ 离心。弃去上清,得到需要的粒细胞;弃去上清,用细胞洗涤液将细胞沉淀重悬,洗涤,4℃ 离心;将得到的细胞用 HBSS 重悬备用。

[0055] 粒细胞提取率及纯度检测:用移液器取细胞悬液,滴于载玻片上并干燥;用有机试剂固定;染色液在载玻片上做细胞染色观察其形态;用水冲洗,晾干并显微镜下观察;显微镜下计数细胞种类并计算粒细胞纯度;细胞活性检测:取少量细胞悬液加入台盼蓝,在显微镜下检测细胞存活情况并计算粒细胞的细胞浓度。

[0056] B. 包被人粒细胞的固相板的制备方法:用 $1 \times$ Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 稀释步骤 A 得到的粒细胞,使其至终浓度约为 1000000cells/mL,然后将悬液加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L,静置于室温,去上清,室温干燥,后用冷甲醇固定并干燥,用封盖膜将固定细胞的微孔板封盖,放置 20℃ 保存备用;

[0057] C. 包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板的制备方法是:以 0.05M 磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液,包被抗原的浓度为 1.0 微克/ml,包被溶液在微孔板的孔中 4℃,24 小时,用去离子水洗涤两次,2% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 小时后,在温度为 20-28℃ 及湿度小于或等于 30% 的条件下干燥 12 小时,然后装袋封口,储存于 4℃ 待用。

[0058] (3)制备辣根过氧化酶连接的标识物抗体:

[0059] 辣根过氧化酶连接抗体的制备方法为碘酸钠法。称辣根过氧化酶溶于双蒸馏水中,加入新鲜配制的 0.1M NaIO_4 溶液。室温避光。对醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,加入碳酸盐缓冲液,然后加入含有抗体(羊抗人 IgG 抗体,美国 ImmunoReagents Inc)的碳酸盐缓冲液,室温反应 2 小时。再加入新鲜配制的 NaBH_4 ,混匀,在 4℃下反应。对 PBS 透析 4℃过夜。随后在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵。之后 3000rpm 离心 0.5 小时,弃上清,将沉淀物溶于 PBS。然后对 PBS 透析 4℃ 4 小时,10000rpm 离心 30 分钟。制得酶的结合物,加入丙三醇,-20℃保存。酶连接的抗体的稀释倍数为 1:70000。稀释液为磷酸盐缓冲液。配置完成后混匀,放置 30 分钟后用肉眼观察无结晶或沉淀析出。

[0060] (4) 洗涤液的配制

[0061] 洗涤液为磷酸盐缓冲液,成分为 135mM NaCl , 2.7mM KCl , 1.5mM KH_2PO_4 , 8mM K_2HPO_4 (pH7.2)

[0062] (5)辣根过氧化酶底物的溶液:A 液为过氧化氢溶液,B 液为四甲基联苯胺溶液;购自 ThermoFisher 公司

[0063] (6) 终止液:2M 硫酸。

[0064] 实施例 2:人血管炎诊断试剂盒

[0065] 一. 试剂盒组成:

[0066] (1) 待检测血清标识物的标准品:抗人 PR3 和 MPO 抗原免疫球蛋白 G。

[0067] (2) 包被有识别标识物特异抗原系统的固相板:包括包被人粒细胞的固相板、包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板;

[0068] (3) 联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体:联接有辣根过氧化酶的羊抗人 IgG 抗体(羊抗人 IgG 抗体,美国 ImmunoReagents Inc)

[0069] (4) 洗涤液:磷酸盐缓冲液;

[0070] (5)辣根过氧化酶底物的溶液:包含 A 液和 B 液,A 液为四甲基联苯胺,B 液为醋酸钠/枸橼酸缓冲液;

[0071] (6) 终止液:2M 硫酸。

[0072] 二. 试剂制法:

[0073] (1) 待检测血清标识物的标准品的制备

[0074] 用通过免疫荧光抗人 PR3 和 MPO 抗体靶抗原特异的检测系统确证的具有高效价抗人 PR3 和 MPO 的血清中制备免疫球蛋白 G 抗血清。

[0075] 取 QAE-SephadexA25 或 A50 经酸处理并在 0.05mol/LpH8.6 的磷酸盐缓冲液中平衡,将水分抽干,称湿重 1g 加于 10ml 血清中,在室温 30min 后,离心或过滤除去离子交换剂。上清液再如此处理一次,即获得较纯的 IgG。经 QAE 化学试剂处理血清并分离后,将高效价的抗 PR3 和 MPO 的免疫球蛋白 G 血清混合制备,置于 56℃水温箱 30min,灭活补体,再加 ProClin300 做稳定剂处理,然后对所获样品用电泳法做纯度检测,通过电泳凝胶上 IgG 条带位置与 mark 条带对比,分析确定其分子量大小,计算其制备的纯度。

[0076] (2) 包被有标识物特异抗原系统的固相微孔板的制备

[0077] A. 提取粒细胞:从健康供血者抽取新鲜的外周血到加有抗凝剂的抽血管中备用;将采集的全血用不含内毒素、钙、镁离子的 HBSS 按比例稀释;稀释后的全血加入含 Ficoll-paque plus 溶液层的上面,离心后,取出外周血单核细胞,并在 HBSS 缓冲液轻轻重

悬,备用;迅速将细胞与葡聚糖轻轻混合,沉降并收集中性粒细胞。再用 HBBS 混,20℃离心。按全血量一定比例加入细胞溶解液,用细胞裂解液体积的 HBSS 缓冲液终止溶解反应,4℃离心。弃去上清,得到需要的粒细胞;弃去上清,用细胞洗涤液将细胞沉淀重悬,洗涤,4℃离心;将得到的细胞用 HBSS 重悬备用。

[0078] 粒细胞提取率及纯度检测:用移液器取细胞悬液,滴于载玻片上并干燥;用有机试剂固定;染色液在载玻片上做细胞染色观察其形态;用水冲洗,晾干并显微镜下观察;显微镜下计数细胞种类并计算粒细胞纯度;细胞活性检测:取少量细胞悬液加入台盼蓝,在显微镜下检测细胞存活情况并计算粒细胞的细胞浓度。

[0079] B. 包被入粒细胞的固相板的制备方法:用 $1 \times$ Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 稀释步骤 A 得到的粒细胞,使其至终浓度约为 1000000cells/mL,然后将悬液加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L,静置于室温,去上清,室温干燥,后用冷甲醇固定并干燥,用封盖膜将固定细胞的微孔板封盖,放置 20℃保存备用;

[0080] C. 包被抗人 PR3 抗原免疫球蛋白 G 的固相板和包被抗人 MPO 抗原免疫球蛋白 G 的固相板的制备方法是:以 0.05M 磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液,包被抗原的浓度为 0.04 微克/mL,包被溶液在微孔板的孔中 4℃,24 小时,用去离子水洗涤两次,2% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 小时后,在温度为 20-28℃及湿度小于或等于 30% 的条件下干燥 12 小时,然后装袋封口,储存于 4℃待用。

[0081] (3) 制备辣根过氧化酶连接的标识物抗体:

[0082] 辣根过氧化酶连接抗体的制备方法为碘酸钠法。称辣根过氧化酶溶于双蒸馏水中,加入新鲜配制的 0.1M NaIO_4 溶液。室温避光。对醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,加入碳酸盐缓冲液,然后加入含有抗体(羊抗人 IgG 抗体,美国 ImmunoReagents Inc)的碳酸盐缓冲液,室温反应 2 小时。再加入新鲜配制的 NaBH_4 混匀,在 4℃下反应。对 PBS 透析 4℃过夜。随后在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵。之后 3000rpm 离心 0.5 小时,弃上清,将沉淀物溶于 PBS。然后对 PBS 透析 4℃ 4 小时,10000rpm 离心 30 分钟。制得酶的结合物,加入丙三醇,-20℃保存。酶连接的抗体的稀释倍数为 1:70000。稀释液为磷酸盐缓冲液。配置完成后混匀,放置 30 分钟后用肉眼观察无结晶或沉淀析出。

[0083] (4) 洗涤液的配制

[0084] 洗涤液为磷酸盐缓冲液,成分为 135mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.5mM KH_2PO_4 , 8mM MK_2HPO_4 (pH7.2)

[0085] (5) 辣根过氧化酶底物的溶液:A 液为过氧化氢溶液,B 液为四甲基联苯胺溶液;购自 ThermoFisher 公司

[0086] (6) 终止液:2M 硫酸。

[0087] 实施例 3:临床检测试验

[0088] 一. 实验材料

[0089] 1. 实施例 1 的试剂盒

[0090] 2. 99 例血管炎患者血清样本

[0091] 二. 检测方法:

[0092] 1. 采用常规医用技术收集全血标本,置血 30 分钟后吸取血清待用。待测血清如在 24 小时内使用,可于 2-8℃条件保存,若需长期存放,应保存于 -20℃以下,并避免反复冻

融。

[0093] 2. 向包被有标识物特异抗原系统的固相板的微孔中加入待检血清样品,静置使其抗原抗体反应结合。

[0094] (1) 用 PBST 将待测血清按比例稀释,每孔加入 100uL,室温振荡孵育;

[0095] (2) 洗涤:去掉孔内溶液,加入 PBST,静置,去掉 PBST,并重复 2 次;

[0096] (3) 酶标二抗:用酶稀释液将联接有辣根过氧化酶的标识物的抗体稀释(1:500-

[0097] 1:2,000,000),每孔 100uL,室温振荡孵育。

[0098] (4) 洗涤:同步骤(2)。

[0099] (5) 显色:加辣根过氧化酶底物的溶液,室温振荡显色 30min,在酶的作用下,酶底物转换成显色物质。这样,通过对所转换的颜色的测定而得到样品中待测标识物的量。根据标准曲线中各已知标准品的浓度与显色的比,可以通过公式来计算待测标识物的浓度值。

[0100] (6) 终止反应:每孔加入终止液,然后测 OD450。

[0101] (7) 随后根据临床资料所定的正常值来确定该病人血中的标识物浓度是否是在正常范围还是在异常范围。

[0102] 试剂盒中标准品可以同步得到标准曲线,待检血清所得 OD 值,代入标准曲线中求得病人血清中抗 PR3 和 MPO 抗体的含量,其抗体含量超过 Cut off 值的病人血清,再根据临床症状,即可确诊病人体内产生高浓度的抗 PR3 和 MPO 抗体,提示其患血管炎。

[0103] 附图 2 为通过本实验方法,检测临床收集的确诊病例血清,其吸光度值的散点分布,由图 2 可知,本方法对病人体内抗体检测可以做到明显的区分度,即可以明显区别有无病症及病症程度(通过所检抗体含量予以判定),给予临床医生确实可信的参考数据。

[0104] 本发明用免疫荧光的方法对血清进行筛查判定 ANCA,能有效排除 ANA 的影响。

[0105] 对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

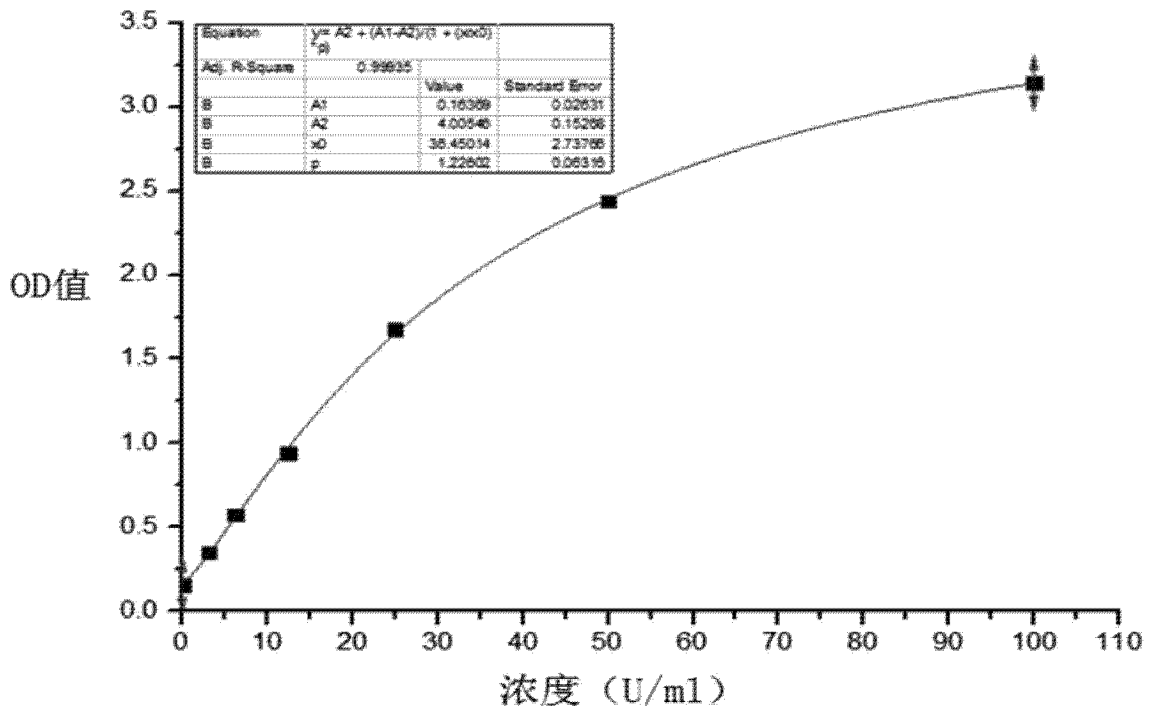


图 1

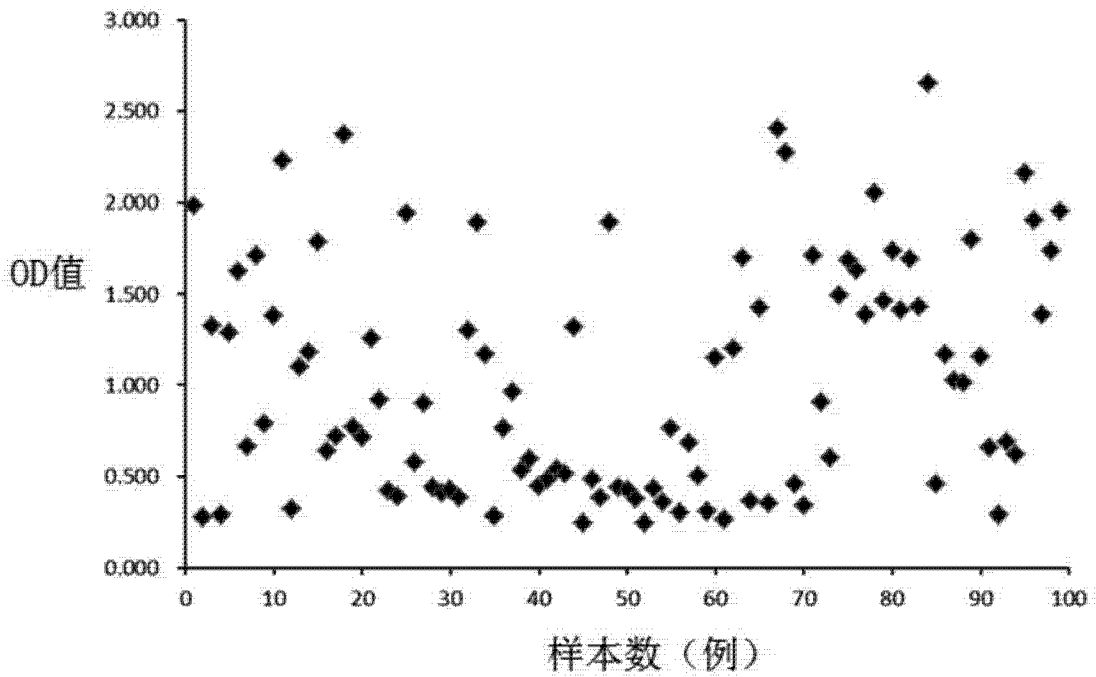


图 2

专利名称(译)	人血管炎诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103713121A	公开(公告)日	2014-04-09
申请号	CN201310737092.7	申请日	2013-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	天津瑞华生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津瑞华生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津瑞华生物科技有限公司		
[标]发明人	杨武 宁义刚		
发明人	杨武 宁义刚		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/551 G01N33/535 G01N2800/328		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人血管炎诊断试剂盒及其制备方法，属于医学实验诊断技术领域。人血管炎诊断试剂盒，包括：（1）待检测血清标识物的标准品；（2）包被有识别标识物特异抗原系统的固相板；（3）连接有辣根过氧化酶的标识物的抗体；（4）洗涤液；（5）辣根过氧化酶底物的溶液；（6）终止液。本发明的优点是：方法灵敏，准确，重复性好，反应快速，无同位素污染；所组成的试剂盒性能稳定，操作简便，适于临床推广应用。

