



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106501522 A

(43)申请公布日 2017.03.15

(21)申请号 201710008195.8

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2017.01.05

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 广州华弘生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城伴河路84号自编二栋  
101

(72)发明人 陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥  
母润红 王涛 苏焱

(74)专利代理机构 北京精金石专利代理事务所  
(普通合伙) 11470

代理人 刘晔

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种人抗肝肾微粒体抗体的快速定量检测  
试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种人抗肝肾微粒体抗体的快速定量检测试剂盒,属于医药生物领域。其为荧光免疫层析检测试纸卡;所述试纸卡是在PVC板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有稀土荧光微球标记LKM-1抗原的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后形成试纸卡。

1. 一种抗LKM-1抗体的快速定量检测试剂盒,其为荧光免疫层析检测试纸卡;所述试纸卡是在PVC板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有稀土荧光微球标记LKM-1抗原的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后形成试纸卡。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,所述稀土荧光微球掺杂有铕元素;所述稀土荧光微球的直径为50-100nm。

3. 根据权利要求1所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,所述LKM-1抗原为细胞色素P450 2D6蛋白(简称CYP2D6蛋白)。

4. 根据权利要求2所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,所述吸附有稀土荧光微球标记LKM-1抗原的制备方法为:

1、稀土荧光微球的活化;

2、稀土荧光微球标记的CYP2D6蛋白制备:

将CYP2D6蛋白与上述活化的稀土荧光微球混合,反应过夜;然后加入硼氢化钠反应;离心洗涤3遍,重悬于的pH7.6的100mM Tris-HCl缓冲液中(含0.5%GSH、0.1%BSA和0.2%木质素磺酸钠),4℃避光保存备用。

5. 根据权利要求4所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,所述吸附荧光微球标记的抗体的结合垫通过以下方法制备:将玻璃纤维膜浸泡于含0.5%GSH、1.5%木质素磺酸钠和0.5%BSA的100mM Tris-HCl缓冲液中,pH7.6;浸泡,然后取出并烘箱烘干,将玻璃纤维膜置于喷台上,用微量喷头将稀土荧光微球标记的LKM-1抗原溶液喷到玻璃纤维膜,即得。

6. 根据权利要求1所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜的制备方法如下:用包被稀释液将兔抗人CYP2D6单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体制成溶液,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,然后置于烘箱中烘干。

7. 根据权利要求6所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,所述包被稀释液为含0.5%BSA和0.5%木质素磺酸钠的100mMTris-HCl缓冲液,pH7.4。

8. 根据权利要求1所述的快速定量检测试剂盒,其特征在于,将玻璃纤维膜浸泡于0.25M Tris缓冲液(pH7.5),含1.2%TritonX-100,2.5%BSA的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干4小时。

## 一种人抗肝肾微粒体抗体的快速定量检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种人抗肝肾微粒体抗体的快速定量检测试剂盒,属于医药生物领域。

### 背景技术

[0002] 自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases)主要包括三种与自身免疫密切相关的、以肝胆损伤为主的疾病:自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis,AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis,PSC)。AIH是一种伴循环自身抗体和高免疫球蛋白血症、病因未明、呈慢性炎性坏死的肝脏疾病,PBC是以自身免疫介导的肝内胆管损伤、以后呈肝纤维化、最终导致肝功能衰竭为特征的一类病因不明的自身免疫性肝脏疾病,PSC是一种原因不明的慢性综合征,其特征是肝外和/或肝内胆管弥漫性炎症及纤维化所引起的慢性胆汁淤积症。

[0003] 近年来,国际上对自身免疫性肝病基础与临床的研究高度重视,并且进展迅速,主要涉及自身免疫性肝病的发病机制、遗传背景、相关自身抗体及其靶抗原性质、临床流行病学、临床诊断及治疗和预后等方面。自身免疫性肝病的诊断主要依靠病史、临床表现、体征和实验室检查结果。肝组织病理学检查被认为是AIH,PBC诊断的“金标准”,但此项检查临床应用具有局限性,例如,自身免疫性肝病的肝活检组织病理学表现特异性不强,非自身免疫性肝病所特有;患者不愿或不适接受此项创伤性检查;此外,目前多数医院采用B超引导下细针穿刺取材进行肝组织病理学检查,此检查受取材标本局限,是否能取得病变组织,对检查结果影响很大。尽管如此,肝组织病理学检查对自身免疫性肝病诊断、鉴别诊断及病变程度的判断至关重要,仍是诊断的重要标准之一。AIH,PBC早期病变(胆管炎期、慢性胆汁淤积期)属临床治疗可逆转期或可部分逆转期,后期或终末期(肝纤维化/肝硬化期、肝衰竭期)属临床治疗不可逆转期,愈后不佳。因此,早期诊断、早期治疗尤为重要。

[0004] 目前自身免疫性肝病的发病机制尚未明确,目前认为遗传易感性是主要因素。AIH存在明显的家族成员集中发病现象,而病毒感染、药物和环境则可能是在遗传易感基础上的促发因素。几乎所有AIH都存在不同程度的肝纤维化,严重病例可出现肝硬化。AIH根据血清免疫学检查可分为I型(ANA、SMA)、II型(抗LKM-1抗体)和III型(抗SLA/LP抗体)。

[0005] 人抗肝肾微粒体I型抗体(抗LKM-1抗体)为自身免疫性肝炎II型的血清学标志,目前临床上抗LKM-1抗体的检测有膜条免疫法和酶联免疫吸附法。膜条免疫法应用的是膜条显色技术,其特点为固定几个项目在同一膜条测定,一般通过手工或者半自动膜条仪进行实验操作,最终通过肉眼进行定性判定,该技术灵敏度低,反应时间长,检测项目只能固定搭配组合,灵活性差。酶联免疫吸附法的灵敏度在膜条免疫法基础上有所提升,但仍然较低,并且线性范围窄,重复性差,反应时间也较长,仍然不能很好满足临床的应用。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种抗LKM-1抗体的快速定量检测试剂盒,其为荧光免疫层析检测试纸卡;所述试纸卡是在PVC板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有稀土荧光微球标记LKM-1抗原的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后形成试纸卡。

[0007] 在本发明的一个实施方案中,所述稀土荧光微球掺杂有铕元素;所述稀土荧光微球的直径为50-100nm。

[0008] 在本发明的另一个实施方案中,所述LKM-1抗原为细胞色素P4502D6蛋白(简称CYP2D6蛋白)。

[0009] 在本发明进一步地实施方案中,所述稀土荧光微球标记LKM-1抗原的制备方法为:

[0010] 1、稀土荧光微球的活化;

[0011] 2、稀土荧光微球标记的CYP2D6蛋白制备:

[0012] 将CYP2D6蛋白与上述活化的稀土荧光微球混合,反应过夜;然后加入硼氢化钠反应;离心洗涤3遍,重悬于的pH7.6的100mM Tris-HCl缓冲液中(含0.5%GSH、0.1%BSA和0.2%木质素磺酸钠),4℃避光保存备用。

[0013] 在本发明另一个实施方案中,所述吸附荧光微球标记LKM-1抗原的结合垫通过以下方法制备:

[0014] 将玻璃纤维膜浸泡于含0.5%GSH、1.5%木质素磺酸钠和0.5%BSA的100mM Tris-HCl缓冲液中,pH7.6;浸泡,然后取出并烘箱烘干,将玻璃纤维膜置于喷台上,用微量喷头将稀土荧光微球标记的LKM-1抗原溶液喷到玻璃纤维膜,即得。

[0015] 在本发明又一个实施方案中,所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜的制备方法如下:

[0016] 用包被稀释液将兔抗人CYP2D6单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体制成溶液,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,然后置于烘箱中烘干。

[0017] 在一个具体实施方案中,所述包被稀释液为含0.5%BSA和0.5%木质素磺酸钠的100mM Tris-HCl缓冲液,pH7.4。

[0018] 在本发明又一个实施方案中,所述样品垫的制备方法如下:

[0019] 将玻璃纤维膜浸泡于0.25M Tris缓冲液(pH7.5),含1.2%Triton X-100,2.5%BSA的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干4小时。

[0020] 在本发明中,所述试纸卡的组装过程如下:在PVC板上依次粘贴经过处理的样品垫、吸附有稀土荧光微球标记的抗体的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后得到试纸大板,按照要求切割成4mm宽,将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0021] 所述试剂盒,检测方法为:1)将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;2)精确吸取100μl血清样本,样本为全血时吸取150μl样本,加入到样本孔中,15-30分钟内用荧光免疫层析分析仪定量判定结果;3)设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示出样品浓度的定量测定结果。

[0022] 在本发明抗LKM-1抗体快速定量检测试剂盒的制备过程中,在喷涂液中添加了木质素磺酸钠,其作为表面活性剂时,不仅抗体稳定性效果极佳,并且由于其配体作用导致对铕元素荧光微球发光强度随着时间延长没有出现减弱现象。另外,考虑到作为LKM-1抗原的CYP2D6蛋白其本身是一种广泛存在于人肝脏微粒体中药物代谢酶,虽然其抗LKM-1抗体具

有最佳的结合效果,但是其体外的稳定性不佳,为此本发明针对CYP2D6蛋白筛选出了一种极佳的特殊稳定剂谷胱甘肽(GSH);从而提高了整体试剂盒的稳定性。

### 具体实施方式

[0023] 还可进一步通过实施例来理解本发明,其中所述实施例说明了一些制备或使用方法。然而,要理解的是,这些实施例不限制本发明。现在已知的或进一步开发的本发明的变化被认为落入本文中描述的和以下要求保护的本发明范围之内。

[0024] 在本发明中,在无特殊说明的前提下,“%”代表重量百分比。

[0025] 实施例1抗LKM-1抗体检测试纸卡制备

[0026] 包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜的制备:

[0027] 用包被稀释液将兔抗人CYP2D6单克隆抗体(LifeSpan BioSciences Inc.)和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到12mg/ml,膜液量为2 $\mu$ l/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为5mm,然后置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干4小时。所述包被稀释液组成为含0.5%BSA和0.5%木质素磺酸钠的100mM Tris-HCl缓冲液,pH7.4。

[0028] 吸附荧光微球标记的抗原的结合垫制备:

[0029] 1、稀土荧光微球的醛基化:

[0030] 取30mg稀土荧光微球,用50mM,pH9.0的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为10分钟,最后重悬于200 $\mu$ l的上述碳酸盐缓冲液中。加入400 $\mu$ l醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时。采用同样的离心法洗涤和重悬到200 $\mu$ l的上述碳酸盐缓冲液中,置于4 $^{\circ}$ C备用。

[0031] 2、稀土荧光微球标记的CYP2D6蛋白的制备:

[0032] 将10mg的CYP2D6蛋白(PROSPEC公司)与上述醛基化的稀土荧光微球溶液混合,4 $^{\circ}$ C反应过夜。然后,加入硼氢化钠至终浓度15mM,4 $^{\circ}$ C反应6小时;然后用50mM pH7.6的Tris-HCl缓冲液,采用离心法洗涤3遍,重悬于200 $\mu$ l的100mM Tris-HCl缓冲液中(含0.5%GSH、0.1%BSA和0.2%木质素磺酸钠),4 $^{\circ}$ C避光保存备用。

[0033] 3、将玻璃纤维膜浸泡于100mM Tris-HCl缓冲液中(含0.5%GSH、1.5%木质素磺酸钠和0.5%BSA,pH7.6),4 $^{\circ}$ C浸泡4小时,然后取出37 $^{\circ}$ C烘箱烘干4小时,备用。将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的CYP2D6蛋白溶液喷到玻璃纤维膜,37 $^{\circ}$ C烘干4小时,备用。

[0034] 样品垫的制备:

[0035] 将玻璃纤维膜浸泡于0.25M Tris缓冲液(pH7.5),含1.2%Triton X-100,2.5%BSA的处理液中,于4 $^{\circ}$ C浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干4小时。

[0036] 试纸卡的组装:在PVC板上依次粘贴经过处理的样品垫、吸附有稀土荧光微球标记的抗体的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后得到试纸大板,按照要求切割成4mm宽,将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0037] 实施例2试纸卡线性范围、精密度、特异性测试和灵敏度测试

[0038] 取含量为0、5、20、50、100和200RU/ml的抗LKM-1抗体标准品溶液,用试纸卡进行测定。

[0039] 检测方法:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡(实施例1制备),平放;精确吸取100 $\mu$ l标准品样本,加入到试纸卡的样本孔中,20分钟后用荧光免疫层析分析仪进行检测。

[0040] 线性:以荧光强度值和对应的标准品浓度建立标准曲线,具体为 $Y(\text{荧光强度}) = 161.1X + 17.4$ ,  $R^2$ 值 $>0.999$ ,说明本发明试纸卡在0-200RU/ml范围内线性良好。

[0041] 数据见下表:

抗LKM-1抗体标准品	荧光强度 (RLU)
0RU/ml	1.9
5RU/ml	804.2
10RU/ml	1626
20RU/ml	3249
50RU/ml	8099
100RU/ml	16141
200RU/ml	32223

[0042] 灵敏度:采用PBS缓冲液作为空白对照,以空白对照2倍荧光强度作为最低检测浓度(即灵敏度),结果表明:0.1RU/ml标准品平行测定5次的平均荧光强度为34.2;而空白对照的平均荧光强度为2.1。说明试纸卡的灵敏度可达0.1RU/ml。

[0043] 精密度:取已知高浓度和低浓度抗LKM-1抗体含量的全血样本,样本抗LKM-1抗体含量分别为17.8RU/ml和94.6RU/ml;采用实施例1制备试纸卡重复测定10次,计算CV。结果表明低浓度样本的CV为1.84%;高浓度样本的CV为2.29%。

[0044] 实施例3稳定性测试

[0045] 将实施例1制备的试纸卡在37 $^{\circ}$ C环境下放置3个月,然后按照实施例2的方法测定试剂盒的标准曲线及 $R^2$ 值,并采用50RU/ml的抗LKM-1抗体标准品对试剂盒进行精密度考察(平行测定10次,计算CV%),具体结果如下:

[0046]

	时间	标准曲线的 $R^2$ 值	高浓度样本 CV%	低浓度样本 CV%
实施例 1	1 个月	0.99	2.89	2.29
	3 个月	0.99	3.64	3.15
对比例 1	1 个月	0.76	8.92	7.73
	3 个月	0.63	14.39	15.67
对比例 2	1 个月	0.79	7.79	6.82
	3 个月	0.69	12.63	10.18
对比例 3	1 个月	0.89	5.63	5.31
	3 个月	0.75	9.28	8.57

[0047] 对比例1试纸卡制备同实施例1,区别在于,在制备各步骤中不添加木质素磺酸钠。

[0048] 对比例2试纸卡制备同实施例1,区别在于,在制备各步骤中不添加GSH。

[0049] 对比例3试纸卡制备同实施例1,区别在于,在制备各步骤中将木质素磺酸钠替换为等量的吐温20。

#### [0050] 实施例4临床测试

[0051] 从医院收集A1H患者及健康人的血液样本,采用实施例1试纸卡对样本进行测定,并且采用相同样本通过ELISA方法进行测定,结果见下表:

样本编号	实施例1	ELISA
1	2.6RU/ml	2.6RU/ml
2	4.2RU/ml	4.3RU/ml
3	29.4RU/ml	29.9RU/ml
4	33.2RU/ml	32.8RU/ml
5	18.7RU/ml	19.2RU/ml

[0052] 本发明内容仅仅举例说明了要求保护的一些具体实施方案,其中一个或更多个技术方案中所记载的技术特征可以与任意的一个或多个技术方案相组合,这些经组合而得到的技术方案也在本申请保护范围内,就像这些经组合而得到的技术方案已经在本发明公开内容中具体记载一样。

专利名称(译)	一种人抗肝肾微粒体抗体的快速定量检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106501522A</a>	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	CN201710008195.8	申请日	2017-01-05
[标]申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
[标]发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/576 G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/5767 G01N33/577		
代理人(译)	刘晔		
其他公开文献	CN106501522B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种人抗肝肾微粒体抗体的快速定量检测试剂盒，属于医药生物领域。其为荧光免疫层析检测试纸卡；所述试纸卡是在PVC板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有稀土荧光微球标记LKM-1抗原的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫，组装后形成试纸卡。

	时间	标准曲线的R <sup>2</sup> 值	高浓度样本 CV%	低浓度样本 CV%
实施例1	1个月	0.99	2.89	2.29
	3个月	0.99	3.64	3.15
对比例1	1个月	0.76	8.92	7.73
	3个月	0.63	14.39	15.67
对比例2	1个月	0.79	7.79	6.82
	3个月	0.69	12.63	10.18
对比例3	1个月	0.89	5.63	5.31
	3个月	0.75	9.28	8.57