



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470848 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910786513.2

(22)申请日 2019.08.23

(71)申请人 安徽恩禾生物技术有限公司

地址 230000 安徽省合肥市高新区创新大道106号明珠产业园5#5层D区

(72)发明人 余旭亮

(74)专利代理机构 合肥律众知识产权代理有限公司 34147

代理人 刘苗

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及多肽化学和免疫学技术领域,具体是公开了一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,所述试剂盒采用双抗原夹心法检测所述人MBP抗体的含量;所述试剂盒内包括包被板、校准品、MBP结合抗原、酶结合物、质控品、显色剂A、显色剂B、终止液和浓缩洗涤液;所述包被板包被有MBP包被抗原,所述MBP包被抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的X片段与载体蛋白偶联制备而成的,所述MBP结合抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的Y片段与载体蛋白偶联制备而成的,所述MBP结合抗原标记有生物素。本发明克服了现有技术的不足,采用双抗原夹心法定量检测人MBP抗体的含量,操作简便、快速,并且检测准确度和精密度好、特异性高、灵敏度好、稳定性好。

1. 一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒采用双抗原夹心法检测所述人MBP抗体的含量;所述试剂盒内包括包被板、校准品、MBP结合抗原、酶结合物、质控品、显色剂A、显色剂B、终止液和浓缩洗涤液;

所述包被板包被有MBP包被抗原,所述MBP包被抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的X片段与载体蛋白偶联制备而成的,所述MBP结合抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的Y片段与载体蛋白偶联制备而成的,所述MBP结合抗原标记有生物素,所述人MBP抗原表位肽的NCBI登录号为CAA35179.1。

2. 根据权利要求1所述的一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,其特征在于:所述MBP包被抗原的浓度为22 μ g/L,所述MBP结合抗原的浓度为24 μ g/L,所述酶结合物为链霉素标记的辣根过氧化物酶,其浓度为3 μ g/L。

3. 根据权利要求1所述的一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,其特征在于:所述显色剂A为10g/L的过氧化脲素溶液,所述显色剂B为2g/L的TMB \cdot 2HCl溶液,所述显色剂A和显色剂B的体积比为1:1。

4. 根据权利要求1所述的一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,其特征在于:所述质控品和校准品来自于人体血清,所述质控品的浓度为7ng/L,所述校准品的浓度梯度为10 μ g/L、5 μ g/L、2 μ g/L、1 μ g/L、0.5 μ g/L、0 μ g/L。

5. 根据权利要求1所述的一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为25倍浓缩的磷酸缓冲液,所述终止液为2M H₂SO₄溶液。

6. 一种基于权利要求1-5任意一项所述髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒试剂盒的制备方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

S1、制备MBP包被抗原以及制备MBP结合抗原;

S2、通过MBP结合抗原和链霉素标记的辣根过氧化物酶的偶联,制备得到MBP结合抗原-HRP标记物;

S3、各种缓冲液及试剂的配制;

S4、采用包被缓冲液以一定比例将MBP包被抗原稀释,100 μ L/孔加入到酶标板,封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕;具体为:

将MBP包被抗原溶于pH=9.6的0.05M的包被缓冲液中,制成预包被液,在酶标板上每孔按0.1 μ g/孔加入100 μ l,置4 $^{\circ}$ C放置18-24小时,取出,甩掉包被液,用样品/洗涤缓冲液洗涤,经1(w/v)%BSA-0.05M乙醇胺封闭16小时、过夜干燥后装入铝铂袋中抽真空密封,并置于4 $^{\circ}$ C保存。

一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽化学和免疫学技术领域,具体属于一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 目前关于MBP-Ab病的确切致病机制尚不清楚,大部分研究认为,识别MBP抗原的特异性B细胞可能存在于外周血,但由于骨髓中缺乏MBP抗原表达,使MBP特异性未成熟B细胞处于无反应状态,同时由于缺乏相应的辅助T细胞(Th细胞)辅助作用,识别MBP的特异性B细胞不能活化,而仅在外周血中增殖。当嗜神经病毒感染机体时,血-脑屏障被破坏,MBP抗原漏入外周,激活CD4+T细胞,对MBP特异性B细胞募集和激活增加,产生大量MBP-IgG;同时促炎T细胞进入中枢,募集MBP特异性B细胞流入中枢,产生相应抗体。在一些体外实验中已证实MBP-IgG可以通过补体和抗体途径介导细胞杀伤作用。而CD4+T细胞在一些细胞因子诱导下分化为Th1、Th17、Th9细胞,分泌TFN- γ 、白细胞介素(IL)-12、IL-23、IL-17A等因子,通过趋化因子吸引不同种类免疫细胞,如髓样细胞、巨噬细胞等,诱发炎性级联反应,介导中枢髓鞘脱失。还有研究者在表达识别MBP的特异性T细胞受体的转基因老鼠中可以观察到自发的视神经炎,支持T细胞在MBP-Ab病中起重要作用。

[0003] MBP-Ab病患者的血液中MBP-Ab(抗MBP抗体)的量会有所升高,如何能够定量、高效的检测出MBP抗体的含量成为业内亟待解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供了一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,克服了现有技术的不足,采用双抗原夹心法定量检测人MBP抗体的含量,操作简便、快速,并且检测准确度和精密度高、特异性高、灵敏度好、稳定性好。

[0005] 为解决上述问题,本发明所采取的技术方案如下:

[0006] 一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒,所述试剂盒采用双抗原夹心法检测所述人MBP抗体的含量;所述试剂盒内包括包被板、校准品、MBP结合抗原、酶结合物、质控品、显色剂A、显色剂B、终止液和浓缩洗涤液;

[0007] 所述包被板包被有MBP包被抗原,所述MBP包被抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的X片段与载体蛋白偶联制备而成的,所述MBP结合抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的Y片段与载体蛋白偶联制备而成的,所述MBP结合抗原标记有生物素,所述人MBP抗原表位肽的NCBI登录号为CAA35179.1。

[0008] 进一步,所述MBP包被抗原的浓度为22 μ g/L,所述MBP结合抗原的浓度为24 μ g/L,所述酶结合物为链霉素标记的辣根过氧化物酶,其浓度为3 μ g/L。

[0009] 进一步,所述显色剂A为10g/L的过氧化脲素溶液,所述显色剂B为2g/L的TMB \cdot 2HCl溶液,所述显色剂A和显色剂B的体积比为1:1。

[0010] 进一步,所述质控品和校准品来自于人体血清,所述质控品的浓度为7ng/L,所述

校准品的浓度梯度为10 μ g/L、5 μ g/L、2 μ g/L、1 μ g/L、0.5 μ g/L、0 μ g/L。

[0011] 进一步,所述浓缩洗涤液为25倍浓缩的磷酸缓冲液,所述终止液为2M H₂SO₄溶液。

[0012] 一种基于上述的髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒的制备方法,所述方法包括如下步骤:

[0013] S1、制备MBP包被抗原以及制备MBP结合抗原;

[0014] S2、通过MBP结合抗原和链霉素标记的辣根过氧化物酶的偶联,制备得到MBP结合抗原-HRP标记物;

[0015] S3、各种缓冲液及试剂的配制;

[0016] S4、采用包被缓冲液以一定比例将MBP包被抗原稀释,100 μ L/孔加入到酶标板,封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕;具体为:

[0017] 将MBP包被抗原溶于pH=9.6的0.05M的包被缓冲液中,制成预包被液,在酶标板上每孔按0.1 μ g/孔加入100 μ l,置4 $^{\circ}$ C放置18-24小时,取出,甩掉包被液,用样品/洗涤缓冲液洗涤,经1(w/v)%BSA-0.05M乙醇胺封闭16小时、过夜干燥后装入铝铂袋中抽真空密封,并置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0018] 本发明与现有技术相比较,本发明的实施效果如下:

[0019] 1.本发明采用双抗原夹心法,使用该检测试剂盒可以有效地检测血液样本(特别是血清样本)中的MBP抗体的水平,操作简便、快速,并且检测准确度和精密度高,能够迅速及时地帮助诊断病情,监测预后。

[0020] 2.本发明稳定性好,抗干扰能力强,结果稳定,重复性好,本发明的试剂盒可保存一年以上。

具体实施方式

[0021] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述,但本发明不仅限于这些实例,在为脱离本发明宗旨的前提下,所为任何改进均落在本发明的保护范围之内。

[0022] 实施例1

[0023] 一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒的组成:

[0024] 1) MBP包被板:包被MBP的微孔板。48孔/96孔板

[0025] 2) MBP校准品1套A-F:来源于人血清,浓度0,0.5,1,2,5,10g/L。

[0026] 1 \times 0.5ml

[0027] 3) MBP结合抗原:生物素标记的人髓鞘碱性蛋白(MBP)。

[0028] 1 \times 2.5ml/1 \times 5.0ml

[0029] 4) MBP-Ab酶结合物:链霉素标记的辣根过氧化物酶。

[0030] 1 \times 5.0ml/2 \times 5.0ml

[0031] 5) MBP质控品:来源于人血清,质控范围为7 μ g/L \pm 1.05 μ g/L。1 \times 0.5ml

[0032] 6) 显色剂A:主要成分为过氧化脲素。1 \times 5.0ml

[0033] 7) 显色剂B:主要成份为3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB \cdot 2HCl)。1 \times 5.0ml

[0034] 8) 浓缩洗涤液(25 \times):浓缩的磷酸缓冲液,使用前按1:24稀释。

[0035] 1 \times 20.0ml

[0036] 9) 终止液:2mol/L硫酸溶液。1 \times 5.0ml

- [0037] 10) 封板膜2张
- [0038] 11) 自封袋 1个
- [0039] 实施例2
- [0040] 一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒的制备方法:
- [0041] 1) 制备MBP包被抗原以及制备MBP结合抗原:
- [0042] 在人MBP抗原表位肽中分别截取X片段与Y片段,分别将X片段与Y片段转化至大肠杆菌中进行培养,收集菌体进行离心后获得重组沉淀的蛋白,对重组蛋白分别进行纯化,得到目的蛋白,分别命名为X蛋白和Y蛋白,X蛋白即为MBP包被抗原,Y蛋白即为MBP结合抗原。
- [0043] 2) 制备MBP结合抗原-HRP标记物:
- [0044] MBP标记抗原和HRP的偶联具体采用NaIO₄氧化法,包括步骤如下:
- [0045] 2.1) 将步骤S1中所得的MBP标记抗原于PBS溶液中4℃透析过夜;
- [0046] 2.2) 紫外分光光度计测定MBP标记抗原浓度;
- [0047] 2.3) 采用分析天平称取10mgHRP溶于2mL超纯水中制备终浓度为5mg/mL的HRP溶液,分析天平称取NaIO₄,溶于超纯水中制备终浓度为20mg/mL的NaIO₄溶液备用;
- [0048] 2.4) 缓慢滴加225μLNaIO₄溶液于2mLHRP溶液中,室温下避光静置20分钟;
- [0049] 2.5) 加入20μL乙二醇于HRP混合溶液中,之后室温下静置30分钟,得到活化好的HRP溶液;
- [0050] 2.6) 取1mL2.1mg/mL的MBP标记抗原缓慢逐滴加入到活化好的HRP溶液中,得到MBP标记抗原-HRP结合物;
- [0051] 2.7) 将MBP标记抗原-HRP结合物于50mMCBpH9.6的溶液中4℃避光透析2.5个小时;
- [0052] 2.8) 分析天平称量NaBH₄溶于水,制备终浓度为4mg/mL的NaBH₄溶液;
- [0053] 2.9) 向步骤2.7)的透析袋中加入162μL的NaBH₄溶液,室温下在摇床上轻轻震动2个小时;
- [0054] 2.10) 在PBS溶液中4℃透析过夜;
- [0055] 2.11) 透析结束后1:1比例加入甘油,-20度保存,即为MBP标记抗原-HRP标记物。
- [0056] 3) 各种缓冲液及试剂的配制:
- [0057] A、包被缓冲液:0.050M、pH9.6的CB(碳酸盐缓冲液)
- [0058] Na₂CO₃:16.0克
- [0059] NaHCO₃:29.0克
- [0060] 蒸馏水溶解,定容至1000ml;
- [0061] B、样品/洗涤缓冲液:pH7.2的10×PBS-Tween 20
- [0062] Na₂HP0₄·12H₂O:58克
- [0063] KH₂P0₄:4克
- [0064] NaCl:100克
- [0065] KCl:4克
- [0066] 蒸馏水溶解,定容至1000ml
- [0067] 加Tween 20:20ml;
- [0068] C、酶标记物稀释液
- [0069] 10×PBS-Tween 20:10ml

- [0070] FCS(小牛血清):20ml
- [0071] 蒸馏水溶解,定容至1000ml
- [0072] 酶稳定剂(可购自上海西宝公司):1克
- [0073] 生物防腐剂(可购自上海西宝公司):1ml;
- [0074] D、显色剂A:
- [0075] 柠檬酸:35.5克
- [0076] 过氧化脲:10克
- [0077] 蒸馏水溶解,定容至1000ml
- [0078] Tween 20:10ml;
- [0079] E、显色剂B:
- [0080] 柠檬酸:120克
- [0081] EDTA-2Na:1克
- [0082] TMB • 2HCl:2克
- [0083] 蒸馏水溶解,定容至1000ml;
- [0084] F、终止液:2M H₂SO₄
- [0085] 浓硫酸(95-98%):22.2ml
- [0086] 蒸馏水:177.3ml
- [0087] 配时将浓硫酸缓慢滴入蒸馏水中,边加边摇匀。
- [0088] 2) 预包被板的制备:
- [0089] 将MBP包被抗原溶于pH=9.6的0.05M的碳酸盐缓冲液中,制成预包被液,在酶标板(可购自深圳金灿华公司)上每孔按0.1 μ g/孔加入100 μ l,置4 $^{\circ}$ C放置18-24小时,取出,甩掉包被液,用样品/洗涤缓冲液洗涤,经1(w/v)%BSA-0.05M乙醇胺封闭16小时、过夜干燥后装入铝铂袋中抽真空密封,并置于4 $^{\circ}$ C保存。
- [0090] 3) 结合抗原和酶结合物(购自北京中杉金桥公司)的稀释比例均由方阵滴定实验确定。链霉素标记的辣根过氧化物酶使用酶标记物稀释液稀释。
- [0091] 实施例3
- [0092] 一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:
- [0093] 1) 洗涤液的配制:在2-8 $^{\circ}$ C下贮存的25 \times 浓缩洗涤液可能在瓶底形成结晶,用500ml容器将整瓶浓缩洗涤液充分溶解于480ml蒸馏水或去离子水中。
- [0094] 2) 将试剂盒平衡至室温(20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C)后,将所需的微孔条取出固定于板架上,编好顺序;
- [0095] 3) 加样:先加入50 μ l待测样本/MBP校准品/MBP质控品,再加入50 μ l MBP结合抗原于相应孔中,轻拍混匀,设空白孔;
- [0096] 4) 温育:用封口膜将条板封好(防止污染),37 $^{\circ}$ C温育30分钟;
- [0097] 5) 洗板:取出反应板,甩尽板中液体,每孔注满洗涤液洗板5次,拍干,在洗涤过程中应避免产生气泡;
- [0098] 6) 加酶:每孔加入两滴或100 μ l的MBP-Ab酶结合物,空白孔不加;
- [0099] 7) 温育:用封口膜或塑料胶条将板封好,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;
- [0100] 8) 洗板:取出反应板,甩尽板中液体,每孔注满洗涤液洗板5次,拍干,在洗涤过程

中应避免产生气泡；

[0101] 9) 显色:每孔加入显色剂A、B溶液各一滴或各50 μ l,充分混匀,置37 $^{\circ}$ C温育15分钟;

[0102] 10) 终止:每孔尽快加入终止液1滴(50l)轻拍混匀;

[0103] 11) 测定:用酶标仪(450nm波长)以空白对照调零(或不设空白,以450/630nm双波长测定),测定各孔OD.值。

[0104] 12) 质量控制:如果MBP-Ab最高浓度校准品OD. \geq 0.8,试验结果为有效。

[0105] 结果计算:以校准品浓度作横坐标,OD.值作纵坐标,以双对数拟合绘制校准曲线。通过待测样本的OD.值可在校准曲线上查出其对应浓度值。

[0106] 表1:校准品浓度和对应的平均吸光度(OD)值

[0107]

浓度 μ g/L	0	0.5	1	2	5	10
平均OD值	0.036	0.181	0.223	0.437	0.667	1.132

[0108] 实施例4

[0109] 对60例病人和112例健康者按上述方式进行血清MBP-Ab的检测,病人血清中的MBP-Ab含量明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表2。

[0110] 表2:两组样本MBP-Ab浓度比较

[0111]

组别	人数	MBP-Ab浓度均值(μ g/L)
患者	60	5.63
对照组	112	2.18

[0112] 由以上数据可知,本发明的试剂盒可有效且特异性地检测血清中的MBP-Ab含量,从而检测出病人和正常人之间的MBP-Ab含量差异,本试剂盒其灵敏度为96.2%,特异性为98.6%,准确率为97.3%。

[0113] 以上内容仅仅是对本发明构思所作的举例和说明,所属本技术领域的技术人员对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代,只要不偏离发明的构思或者超越本权利要求书所定义的范围,均应属于本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110470848A	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201910786513.2	申请日	2019-08-23
[标]发明人	余旭亮		
发明人	余旭亮		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6893		
代理人(译)	刘苗		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及多肽化学和免疫学技术领域，具体是公开了一种髓鞘碱性蛋白抗体检测试剂盒，所述试剂盒采用双抗原夹心法检测所述人MBP抗体的含量；所述试剂盒内包括包被板、校准品、MBP结合抗原、酶结合物、质控品、显色剂A、显色剂B、终止液和浓缩洗涤液；所述包被板包被有MBP包被抗原，所述MBP包被抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的X片段与载体蛋白偶联制备而成的，所述MBP结合抗原是通过使所述人MBP抗原表位肽中的Y片段与载体蛋白偶联制备而成的，所述MBP结合抗原标记有生物素。本发明克服了现有技术的不足，采用双抗原夹心法定量检测人MBP抗体的含量，操作简便、快速，并且检测准确度和精密度好、特异性高、灵敏度好、稳定性好。

[0109] 依此方法进行实验，结果如表1所示。

[0111]

组别	人数	MBP-Ab浓度均值(μg/L)
患者	60	5.63
对照组	112	2.18

[0112] 由以上数据可知，本发明的试剂盒可有效且特异地检测血清中的MBP-Ab含量，