



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104634962 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310553868. X

(22) 申请日 2013. 11. 11

(71) 申请人 中国计量科学研究院

地址 100013 北京市北三环东路 18 号中国
计量科学研究院

(72) 发明人 刘瑛颖 王晶 隋志伟 张玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种抗核抗体定量检测试剂盒和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于定量检测匀质型或斑点型抗核抗体的试剂盒和其使用方法。本试剂盒包括:(1)Hep-2 细胞抗原片;(2) 荧光标记二抗;(3) 荧光强度校准微球;(4) 缓冲剂;(5) 封片剂;(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。所述试剂盒中提供的(1)Hep-2 细胞抗原片和(2) 荧光标记二抗与待测血清样本进行间接免疫荧光反应,待测(1)Hep-2 细胞抗原片中加入(3) 荧光强度校准微球,通过荧光显微镜进行观测并进行显微图像拍摄,利用显微图像软件进行荧光强度分析,根据所述试剂盒提供的(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书将荧光强度值转换成相应的血清抗核抗体滴度值,从而实现待测血清样本中匀质型或斑点型抗核抗体的定量检测。

1. 一种用于人血清中抗核抗体定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:(1)Hep-2 细胞抗原片;(2) 荧光标记二抗;(3) 荧光强度校准微球;(4) 缓冲剂;(5) 封片剂;(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于用于均质型或斑点型抗核抗体的定量检测。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中(1)Hep-2 细胞抗原片为预制或市售的。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中(2) 荧光标记二抗其特征在于所标记荧光染料为黄绿色荧光染料。

5. 根据权利要求 4 所述的荧光标记二抗,其所标记的荧光染料的特征在于最大激发波长范围 488nm 左右,最大激发波长范围 520nm 左右。

6. 根据权利要求 4 所述的荧光标记二抗,其所标记的荧光染料的特征在于荧光稳定性好,光漂白速率低。

7. 根据权利要求 5 和 6 所述的荧光染料,优选是 DyLight488、Alexa Fluor488 等。

8. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中(2) 荧光标记二抗是抗人抗体(IgG+H) 型抗体,优选是山羊抗人(IgG+H) 型抗体。

9. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中(3) 荧光强度校准微球的特征在于其荧光特性量值应符合所选择荧光二抗的荧光特性范围。

10. 根据权利要求 8 所述的荧光强度校准微球,其直径为 5-10 μm ,批内变异系数应小于 3%。

11. 根据权利要求 8 所述的荧光强度校准微球,可以为任意材料制成的,包括有机材料,如聚苯乙烯、聚苯乙烯交联 DVB、聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA、聚葡萄糖等;或者无机材料,如二氧化硅;优选是聚苯乙烯。

12. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中(4) 缓冲剂可以是磷酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐等,优选是磷酸盐缓冲剂;pH 值范围是 7.2 ~ 7.6,优选是 7.4。

13. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中(5) 封片剂是 50%缓冲(0.5mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.0 ~ 9.5) 甘油封固,也可以是市售的不同的封片剂类型,优选含有抗荧光淬灭剂的封片剂。

14. 一种新型的人血清中抗核抗体定量检测方法,其特征在于通过显微图像灰度分析经过间接免疫荧光反应的 Hep-2 细胞抗原片上的细胞核荧光强度来表征人血清中均质型或斑点型抗核抗体浓度。具体流程是:根据试剂盒提供的(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书在 Hep-2 细胞抗原片上进行间接免疫反应,步骤为:

(1) 第一次孵育:在预制的 Hep-2 细胞抗原片上滴加 25 μl 的 1 : 100 稀释的检测血清,在室温进行反应 30 分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

(2) 第一次洗涤:用缓冲液冲洗掉存留血清液体,将抗原片放入缓冲液中进行浸泡,间或进行轻微震荡。

(3) 第二次孵育:在细胞抗原片上再次提交经稀释至工作浓度的荧光抗体,在室温或 37°C 染色 30 分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

(4) 第二次洗涤:用缓冲液冲洗掉存留的荧光抗体,将抗原片放入缓冲液中进行浸泡,间或进行轻微震荡。

(5) 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

(6) 用封片剂对封固,待进行荧光显微镜镜检。

本发明采用的镜检系统必须是带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。通过图像分析软件测定数字荧光强度,选测定面积为 $S > 1000\text{Pixel}$,测定选定对象内的平均荧光强度。得到的样本实测平均荧光灰度值和荧光强度校准微球的实测平均荧光灰度值,根据试剂盒提供的荧光强度校准微球的标称荧光强度值,通过下面公式换算得到样本的实际荧光灰度值:

$$I_{488} = \frac{(I_m - I_b) \times I_s}{I_u}$$

式中, I_{488} - 被测对象的荧光强度值;

I_m - 被测对象的实测值;

I_b - 背景值的实测读数;

I_s - 标准微球的实测读数;

I_u - 标准微球的荧光强度确定值。

参考试剂盒中提供的 (7) 荧光强度定量分析说明书中的荧光灰度值和滴度对应表 (附表 1) 得到检测 血清中抗核抗体的滴度。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第一次孵育中滴加稀释 1 : 10-1 : 1000 的检测血清,优选稀释 1 : 100 的检测血清。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述滴加血清量是 10-50 μl ,优选是 25 μl 。

17. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第一次孵育反应温度是 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$,优选是 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

18. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第一次孵育反应时间是 20 ~ 50 分钟,优选是 30 分钟。

19. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第一次洗涤的浸泡时间为 3 ~ 7 分钟,优选是 5 分钟。

20. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第二次孵育反应使用的荧光抗体被稀释至染色效价 1 : 4 至 1 : 32,优选 1 : 8 和 1 : 16。

21. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述稀释的荧光抗体的滴加量是 10-50 μl ,优选是 20 μl 。

22. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第二次孵育反应温度是 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$,优选是 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

23. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第二次孵育反应时间是 20 ~ 50 分钟,优选是 30 分钟。

24. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述间接免疫荧光反应的第二次洗涤的浸泡时间为 3 ~ 7 分钟,优选是 5 分钟。

25. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于显微图像拍摄的曝光时间小于 1 秒,优选是 600-800 毫秒,更加优选是 800 毫秒。

26. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于所述 (7) 荧光强度定量分析说明书提供了荧光灰度值和滴度对应表 (附表 1) 。

一种抗核抗体定量检测试剂盒和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种定量检测人血清中抗核抗体的试剂盒和使用方法,所述试剂盒用于人血清中均质型或斑点型抗核抗体的定量检测。

背景技术

[0002] 抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA) 又称抗核酸抗原抗体,是一组将自身真核细胞的各种成分脱氧核糖核蛋白 (DNP)、DNA、可提取的核抗原 (ENA) 和 RNA 等作为靶抗原的自身抗体的总称,主要存在于血清中。抗核抗体在多种自身免疫病中均呈不同程度的阳性率,如系统性红斑狼疮 (SLE, 95%~100%)、类风湿性关节炎 (RA, 10%~20%)、混合性结缔组织病 (MCTD, 80%~100%)、干燥综合症 (SjS, 10%~40%)、全身性硬皮病 (85%~90%)、狼疮性肝炎 (95%~100%)、原发性胆汁性肝硬化 (95%~100%) 等。

[0003] 目前,全世界约有 6000 个实验室检测抗核抗体,超过 90% 的检测实验室用经典的间接免疫荧光法 (IFA)。通过梯度稀释检测血清样本测定其自身抗体滴度可实现血清中抗核抗体的定量。但是,作为间接免疫荧光检测量化指标的细胞核荧光信号以前一直依赖于检测人员的肉眼主观判定,这在很大程度造成了定量结果缺乏重复性、可信性。并且现有的间接免疫荧光滴度定量方法需要进行连续梯度稀释,操作繁琐,工作量大,造成了工作效率降低,检测样本数量受限。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种定量检测人血清中抗核抗体的试剂盒和其使用方法,通过本发明提供的方法使用该试剂盒可以简化抗核抗体检测试验步骤,消除实验操作者判断的主观因素和检测仪器差异性带来的负面影响,从而使人血清抗核抗体定量检测结果更加精确和客观可信。

[0005] 本发明提供的抗核抗体检测试剂盒由以下几部分构成:(1)Hep-2 细胞抗原片;(2) 荧光标记二抗;(3) 荧光强度校准微球;(4) 缓冲剂;(5) 封片剂;(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。

[0006] 本发明所述的试剂盒中使用 Hep-2 细胞抗原片可采用市售的预制细胞抗原片,如德国欧蒙公司医学诊断有限公司、美国伯乐公司和北京和杰创新生物生物医学科技有限公司提供的,或可根据现有的文献方法制备 Hep-2 细胞抗原片,例如《细胞培养抗原片的简易快速制备与应用》。

[0007] 本发明中所用的荧光标记二抗是黄绿荧光染料标记的抗人抗体 (IgG+H) 型,目前用于抗核抗体间接免疫荧光检测的荧光标记二抗的荧光染料为异硫氰酸荧光素 FITC (最大激发波长:488nm,最大发射波长:525nm),但是 FITC 光漂白效率过高,应用于本发明中易导致的图像采集条件的不一致性,从而造成图像分析数据之间的可比性差,因此不适用于本发明的定量检测方法。本发明所用的荧光染料的特征性激发波长 490nm 左右,发射波长为 520nm 左右,例如 Alexa Fluor488 (最大激发波长:493nm,最大发射波长:518nm)、

Dylight488(最大激发波长:493nm,最大发射波长:518nm)等荧光性能稳定的荧光染料。所述的荧光染料标记的抗体是哺乳动物抗人(IgG+H)型抗体,优选来源于羊的二抗。

[0008] 本发明的试剂盒提供了荧光强度校准微球,用于校准实际测量中不同仪器或不同条件下获得的显微图像的荧光强度值。本发明提供的荧光强度校准微球的特征在于其荧光特性量值应符合所选择荧光二抗的荧光特性范围,即其激发波长范围应为490nm左右,发射波长520nm左右。所述荧光校准微球的荧光强度值和微球直径的批内变异系数均应小于3%,荧光标准微球的直径为3-5 μ m。该荧光校准微球可以由合适的任意材料制成,包括有机材料,如聚苯乙烯、聚苯乙烯交联DVB、聚甲基丙烯酸甲酯PMMA、聚葡萄糖等;或者无机材料,如二氧化硅。本发明的试剂盒提供的荧光强度校准微球为具有一系列荧光强度值的微球,本发明提供的荧光强度校准微球的荧光强度值为通过多台荧光显微镜标定的灰度值。

[0009] 本发明提供的缓冲剂为磷酸盐缓冲剂,此外也可以选择其它缓冲盐类,如柠檬酸盐、Tris-盐酸等;pH值范围是7.2~7.6,优选是7.4;浓度优选是0.01M。优选洗涤过程中加入Tween20来减少抗原抗体的非特异性结合,Tween20浓度是0.01%-0.1%(w/v),优选是0.05%(w/v)。

[0010] 本发明提供的封片剂为50%缓冲液(0.5mol/L碳酸盐缓冲液pH9.0~9.5)+50%甘油,此外也可以选择其它类型也可以是市售的不同的封片剂类型,优选含有抗荧光淬灭剂,如P-苯二胺、n-丙基没食子酸盐、1,4-二偶氮双环[2,2,2]-辛烷等,其中优选P-苯二胺。

[0011] 本发明的另一特征在于提供了一种新型的人血清抗核抗体定量检测方法,其特征在于通过显微图像灰度分析经过间接免疫荧光反应的Hep-2细胞核荧光强度来表征人血清中均质型或斑点型抗核抗体浓度。本方法仍然是以抗核抗体检测“金标准”-间接免疫反应为基础,但是采用了显微图像对检测抗原片上Hep-2细胞核的荧光染色强度进行了分析和定量,通过荧光强度的显微图像灰度值对应了不同浓度的血清抗核抗体。本发明提供的方法具体流程是:根据试剂盒提供的(6)实验操作与荧光强度定量分析说明书在Hep-2细胞抗原片上进行间接免疫反应,步骤为:

[0012] 1. 第一次孵育:在预制的Hep-2细胞抗原片上滴加25 μ l的1:100稀释的检测血清,在室温进行反应30分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

[0013] 2. 用PBS+Tween20缓冲液冲洗掉存留血清液体,将抗原片放入pH7.4的PBS+Tween缓冲液中浸泡5min,间或进行轻微震荡。

[0014] 3. 第二次孵育:在细胞抗原片上再次提交经稀释至染色效价如1:8或1:16的荧光抗体,在室温或37 $^{\circ}$ C染色30分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

[0015] 4. 用PBS+Tween20缓冲液冲洗掉存留的荧光抗体,将抗原片放入pH7.4的PBS+Tween缓冲液中浸泡5min,间或进行轻微震荡。

[0016] 5. 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

[0017] 6. 用封片剂对封固,待进行荧光显微镜镜检。

[0018] 本发明使用的显微镜系统的特征在于带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。显微图像拍摄的曝光时间设定为小于1s,优选为600ms-800ms,更加优选是800ms。在本发明中,采用计算机分析软件测定数字荧光强度,选测定面积为 $S>1000$ Pixel,测定选定对像内的平均灰度值来代表荧光强度。得到的样本实测平均荧光灰度值和荧光强度校准微球的实

测平均荧光灰度值,根据试剂盒提供的荧光强度校准微球的标称荧光强度值,通过下面公式换算得到样本的实际荧光灰度值:

$$[0019] \quad I_{488} = \frac{(I_m - I_b) \times I_s}{I_u}$$

[0020] 式中, I_{488} - 被测对象的荧光强度值;

[0021] I_m - 被测对象的实测灰度值;

[0022] I_b - 背景值的实测灰度值;

[0023] I_s - 标准微球的实测灰度值;

[0024] I_u - 标准微球的标定灰度值。

[0025] 参考试剂盒中提供的 (6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书中的荧光强度灰度值和滴度对应表 (附表 1) 得到检测血清中抗核抗体的滴度。

[0026] 附表 1

[0027]

图像灰度值(8bit)	34~45	55~76	100~171	184~224	225~244		
图像灰度值(16bit)	ND	200~280	320~430	1520~1680	2480~2720	3500~3700	3800~4100
滴度值	1:100	1:320	1:1000	1:3200	1:10000	1:32000	1:100000

[0028] 本发明的抗核抗体荧光显微定量方法主要是用于匀质型或斑点型抗核抗体,而着丝点型或核仁型抗核抗体由于其 Hep-2 细胞抗原片的间接免疫荧光染色效果为大量分散的小荧光颗粒,经研究发现通过图像分析系统无法有效地计算和统计荧光强度,因此不适用于本发明提供的试剂盒和使用方法。

[0029] 通过以下列举的不同实施例可以更好地理解本发明提供的抗核抗体定量方法。

具体实施方式

[0030] 实施例一:在本实施例中,试剂盒包括 (1)Hep-2 细胞抗原片;(2) 荧光标记二抗;(3) 荧光强度校准微球;(4) 缓冲剂;(5) 封片剂;(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。所述的 Hep-2 细胞抗原片从德国欧蒙医学诊断有限公司购得,荧光标记二抗为 DyLight488 标记的山羊抗人 (IgG+H) 型抗体 (最大激发波长:493nm,最大发射波长:518nm)。所述荧光强度标准微球由聚苯乙烯制成,批内平均直径 $5 \mu\text{m}$ ($\text{CV}<3\%$),批内荧光强度均匀 ($\text{CV}<3\%$),最大激发波长 505nm,最大发射波长 515nm。间接免疫荧光反应过程如下开展:

[0031] 1. 第一次孵育:在预制的 Hep-2 细胞抗原片上滴加 $25 \mu\text{l}$ 的 1:100 稀释的检测血清,在室温进行反应 30 分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

[0032] 2. 用 PBS (0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20 (0.05% w / v) 冲洗掉存留血清液体,将抗原片放入 PBS (0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20 (0.05% w / v) 中浸泡 5min,间或进行轻微震荡。

[0033] 3. 第二次孵育:在细胞抗原片上再次提交经稀释至染色效价如 1:8 或 1:16 的 DyLight488 荧光抗体,在室温或 37°C 染色 30 分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

[0034] 4. 用 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.05% w / v) 缓冲液冲洗掉存留的荧光抗体, 将抗原片放入 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.05% w / v) 中浸泡 5min, 间或进行轻微震荡。

[0035] 5. 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

[0036] 6. 用 50% 缓冲 (碳酸盐缓冲液 0.5M, pH9.0 ~ 9.5) 甘油封固, 进行荧光显微镜镜检。

[0037] 该实施例中所使用的镜检系统必须是带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。显微图像拍摄的曝光时间设定为 800ms。在本实施例中, 采用计算机软件 ipwin32(Image-Pro plus) 测定数字荧光强度, 选测定面积为 $S > 1000 \text{Pixel}$, 测定选定对像内的平均灰度值来代表荧光强度。得到的样本实测平均荧光灰度值和荧光强度校准微球的实测平均荧光灰度值, 根据试剂盒提供的荧光强度校准微球的标定荧光强度灰度值, 通过下面公式换算得到样本的实际荧光灰度值:

$$[0038] \quad I_{488} = \frac{(I_m - I_b) \times I_s}{I_u}$$

[0039] 式中, I_{488} - 被测对象的荧光强度值;

[0040] I_m - 被测对象的实测灰度值;

[0041] I_b - 背景实测灰度值;

[0042] I_s - 标准微球的实测灰度值;

[0043] I_u - 标准微球的标定灰度值。

[0044] 参考本发明的试剂盒中提供的 (6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书中的荧光灰度值和滴度对应表 (附表 1) 得到检测血清中抗核抗体的滴度。

[0045] 实施例二: 在本实施例中, 试剂盒包括 (1) Hep-2 细胞抗原片; (2) 荧光标记二抗; (3) 荧光强度校准微球; (4) 缓冲剂; (5) 封片剂; (6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。所述的 Hep-2 细胞抗原片从德国欧蒙医学诊断有限公司购得, 荧光标记二抗为 Alexa Fluor488 标记的山羊抗人 (IgG+H) 型抗体 (激发波长: 493nm, 发射波长: 518nm)。荧光强度标准微球由聚苯乙烯制成, 平均直径 $5 \mu\text{m}$ ($\text{CV} < 3\%$), 荧光强度均匀 ($\text{CV} < 3\%$), 最大激发波长 488nm, 最大发射波长 510nm。间接免疫荧光反应过程如下开展:

[0046] 1. 在预制的 Hep-2 细胞抗原片上滴加 $25 \mu\text{l}$ 的 1:100 稀释的检测血清, 在室温或 37°C 进行反应 30 分钟, 细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内, 防止干燥。

[0047] 2. 用 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 缓冲液冲洗掉存留血清液体, 将抗原片放入 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 中浸泡 5min, 间或进行轻微震荡。

[0048] 3. 在细胞抗原片上再次提交经稀释至染色效价如 1:8 或 1:16 的 Alexa Fluor488 荧光抗体, 在室温或 37°C 染色 30 分钟, 细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内, 防止干燥。

[0049] 4. 用 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 冲洗掉存留的荧光抗体, 将抗原片放入 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 中浸泡 5min, 间或进行轻微震荡。

[0050] 5. 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

[0051] 6. 用 50% 缓冲 (0.5mol / L 碳酸盐缓冲液 pH9.0 ~ 9.5) + 50% 甘油封固, 待进行

荧光显微镜镜检。

[0052] 该实施例中所使用的镜检系统必须是带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。具体操作方法如实施例一。

[0053] 实施例三：在本实施例中，试剂盒包括 (1) Hep-2 细胞抗原片；(2) 荧光标记二抗；(3) 荧光强度校准微球；(4) 缓冲剂；(5) 封片剂；(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。所述的 Hep-2 细胞抗原片从德国欧蒙医学诊断有限公司购得，荧光标记二抗为 Alexa Fluor488 标记的山羊抗人 (IgG+H) 型抗体 (激发波长：493nm, 发射波长：518nm)。荧光强度标准微球由聚苯乙烯交联 DVB 制成，平均直径 4 μ m (CV<3%)，荧光强度均匀 (CV<3%)，最大激发波长 470nm, 最大发射波长 510nm。间接免疫荧光反应过程如下开展：

[0054] 1. 在预制的 Hep-2 细胞抗原片上滴加 25 μ l 的 1:100 稀释的检测血清，在室温或 37°C 进行反应 30 分钟，细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内，防止干燥。

[0055] 2. 用柠檬酸盐缓冲液 (0.01M, pH7.2)+Tween20 (0.05% w/v) 冲洗掉存留血清液体，将抗原片放入柠檬酸盐缓冲液 (0.01M, pH7.2)+Tween20 (0.05% w/v) 中浸泡 5min, 间或进行轻微震荡。

[0056] 3. 在细胞抗原片上再次提交经稀释至染色效价如 1:8 或 1:16 的 Alexa Fluor488 荧光抗体，在室温或 37°C 染色 30 分钟，细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内，防止干燥。

[0057] 4. 用柠檬酸盐缓冲液 (0.01M, pH7.2)+Tween20 (0.05% w/v) 冲洗掉存留的荧光抗体，将抗原片放入柠檬酸盐缓冲液 (0.01M, pH7.2)+Tween20 (0.05% w/v) 中浸泡 5min, 间或进行轻微震荡。

[0058] 5. 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

[0059] 6. 用 50% 缓冲 (0.5mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.0 ~ 9.5)+50% 甘油 +P- 苯二胺 (1.0g/L) 封固，待进行荧光显微镜镜检。

[0060] 该实施例中所使用的镜检系统必须是带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。具体操作方法同实施例一。

[0061] 实施例四：在该实施例中，所使用的试剂盒包括 (1) Hep-2 细胞抗原片；(2) 荧光标记二抗；(3) 荧光强度校准微球；(4) 缓冲剂；(5) 封片剂；(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。制备所述的 Hep-2 细胞抗原片，制备方法如下展开：

[0062] 待 Hep-2 细胞生长至单层时用 GKN 液洗两次，加 0.25% 胰蛋白酶 37°C 消化至细胞复圆，吸出消化液，加少量培养液吹打制备成高密度的细胞悬液。将细胞种入微孔玻片内或在载玻片 1/2 端用特种铅笔画一至数个圆圈，然后将细胞种入。细胞密度以能覆盖圆圈并有少量细胞堆积，贴壁后可见片状单层及高密度单个细胞为佳。将培养片置湿盒内 37°C 5% CO₂ 孵箱培养 4、18h, 在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况。当细胞贴壁达到要求时，取出载片用生理盐水轻轻冲洗干净，立即冷风吹干或 37°C 温箱烤干。选用丙酮、甲醇等固定剂固定，自然干燥或水洗干燥后置冰箱备用。

[0063] 本实施例所选用的荧光标记二抗为 AlexaFluor488 标记的山羊抗人 (IgG+H) 型抗体 (激发波长：493nm, 发射波长：530nm)。荧光强度标准微球由聚苯乙烯制成，平均直径 5 μ m (CV<3%)，荧光强度均匀 (CV<3%)，最大激发波长 488nm, 最大发射波长。间接免疫荧光反应过程如下开展：

[0064] 1. Hep-2 细胞抗原片上滴加 25 μ l 的 1:100 稀释的检测血清，在室温或 37°C 进行

反应 30 分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

[0065] 2. 用 PBS(0.01M,pH7.4) 缓冲液 +Tween20(0.1% w / v) 冲洗掉存留血清液体,将抗原片放入 PBS(0.01M,pH7.4) 缓冲液 +Tween20(0.1% w / v) 中浸泡 5min,间或进行轻微震荡。

[0066] 3. 在细胞抗原片上再次提交经稀释至染色效价如 1:8 或 1:16 的荧光抗体,在室温或 37℃ 染色 30 分钟,细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内,防止干燥。

[0067] 4. 用 PBS(0.01M,pH7.4) 缓冲液 +Tween20(0.1% w / v) 冲洗掉存留的荧光抗体,将抗原片放入 PBS(0.01M,pH7.4) 缓冲液 +Tween20(0.1% w / v) 中浸泡 5min,间或进行轻微震荡。

[0068] 5. 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

[0069] 6. 用 50% 缓冲 (0.5mol / L 碳酸盐缓冲液 pH9.0 ~ 9.5) 甘油封固,待进行荧光显微镜镜检。

[0070] 该实施例中所使用的镜检系统必须是带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。具体操作方法如实施例一。在该实施例中采用了图像分析系统 Image J 测定数字荧光强度。具体操作方法如下开展:选测定面积为 $S > 1000 \text{Pixel}$,测定选定对像内的平均灰度值来代表荧光强度。得到的样本实测平均荧光灰度值和荧光强度校准微球的实测平均荧光灰度值,根据试剂盒提供的荧光强度校准微球的标定荧光强度灰度值,通过下面公式换算得到样本的实际荧光灰度值:

$$[0071] \quad I_{488} = \frac{(I_m - I_b) \times I_s}{I_u}$$

[0072] 式中, I_{488} - 被测对象的荧光强度值;

[0073] I_m - 被测对象的实测灰度值;

[0074] I_b - 背景实测灰度值;

[0075] I_s - 标准微球的实测灰度值;

[0076] I_u - 标准微球的标定灰度值。

[0077] 参考试剂盒中提供的 (6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书中的荧光灰度值和滴度对应表 (附表 1) 得到检测血清中抗核抗体的滴度。

[0078] 实施例五:在该实施例中,所使用的试剂盒包括 (1)Hep-2 细胞抗原片;(2) 荧光标记二抗;(3) 荧光强度校准微球;(4) 缓冲剂;(5) 封片剂;(6) 实验操作与荧光强度定量分析说明书。制备所述的 Hep-2 细胞抗原片,制备方法如下展开:

[0079] 待 Hep-2 细胞生长至单层时用 GKN 液洗两次,加 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化至细胞复圆,吸出消化液,加少量培养液吹打制备成高密度的细胞悬液。将细胞种入微孔玻片内或在载玻片 1 / 2 端用特种铅笔画一至数个圆圈,然后将细胞种入。细胞密度以能覆盖圆圈并有少量细胞堆积,贴壁后可见片状单层及高密度单个细胞为佳。将培养片置湿盒内 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 4、18h,在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况。当细胞贴壁达到要求时,取出载片用生理盐水轻轻冲洗干净,立即冷风吹干或 37℃ 温箱烤干。20℃ 预冷甲醇溶液固定 5 分钟、-20℃ 预冷丙酮溶液固定 1 分钟、蒸馏水快速冲洗一次,自然干燥或水洗干燥后置冰箱备用。

[0080] 本实施例所选用的荧光标记二抗为 AlexaFluor488 标记的山羊抗人 (IgG+H) 型

抗体（激发波长：493nm，发射波长：530nm）。荧光强度标准微球由二氧化硅制成，平均直径 8 μm (CV<3%)，荧光强度均匀 (CV<3%)，最大激发波长 488nm，最大发射波长 510nm。间接免疫荧光反应过程如下开展：

[0081] 1. Hep-2 细胞抗原片上滴加 25 μl 的 1:100 稀释的检测血清，在室温或 37℃ 进行反应 30 分钟，细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内，防止干燥。

[0082] 2. 用 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 冲洗掉存留血清液体，将抗原片放入 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 中浸泡 5min，间或进行轻微震荡。

[0083] 3. 在细胞抗原片上再次提交经稀释至染色效价如 1:8 或 1:16 的荧光抗体，在室温或 37℃ 染色 30 分钟，细胞抗原片置入能保持潮湿的染色盒内，防止干燥。

[0084] 4. 用 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 冲洗掉存留的荧光抗体，将抗原片放入 PBS(0.01M, pH7.4) 缓冲液 + Tween20(0.1% w / v) 中浸泡 5min，间或进行轻微震荡。

[0085] 5. 加入用于荧光强度校准的荧光强度标准微球。

[0086] 6. 用 50% 缓冲 (0.5mol / L 碳酸盐缓冲液 pH9.0 ~ 9.5) + 50% 甘油 + P- 苯二胺 (1.0g/L) 封固封固，待进行荧光显微镜镜检。

[0087] 该实施例中所使用的镜检系统必须是带有图像拍摄系统的荧光显微镜系统。具体操作方法同实施例四。

专利名称(译)	一种抗核抗体定量检测试剂盒和使用方法		
公开(公告)号	CN104634962A	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201310553868.X	申请日	2013-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国计量科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量科学研究院		
[标]发明人	刘瑛颖 王晶 隋志伟 张玲		
发明人	刘瑛颖 王晶 隋志伟 张玲		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/564 G01N21/6428		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于定量检测匀质型或斑点型抗核抗体的试剂盒和其使用方法。本试剂盒包括：(1)Hep-2细胞抗原片；(2)荧光标记二抗；(3)荧光强度校准微球；(4)缓冲剂；(5)封片剂；(6)实验操作与荧光强度定量分析说明书。所述试剂盒中提供的(1)Hep-2细胞抗原片和(2)荧光标记二抗与待测血清样本进行间接免疫荧光反应，待测(1)Hep-2细胞抗原片中加入(3)荧光强度校准微球，通过荧光显微镜进行观测并进行显微图像拍摄，利用显微图像软件进行荧光强度分析，根据所述试剂盒提供的(6)实验操作与荧光强度定量分析说明书将荧光强度值转换成相应的血清抗核抗体滴度值，从而实现待测血清样本中匀质型或斑点型抗核抗体的定量检测。

$$I_{488} = \frac{(I_m - I_b) \times I_s}{I_{488}}$$