



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107522780 A

(43)申请公布日 2017. 12. 29

(21)申请号 201710944582.2

(22)申请日 2017.10.12

(71)申请人 南京精竞生物科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市鼓楼区和燕路
63号1期302室

(72)发明人 陆金春

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

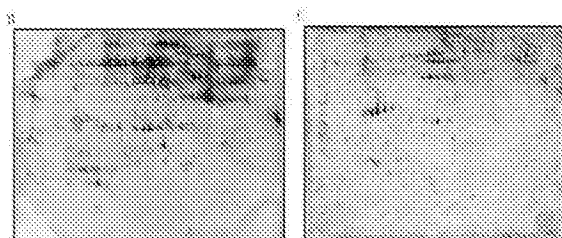
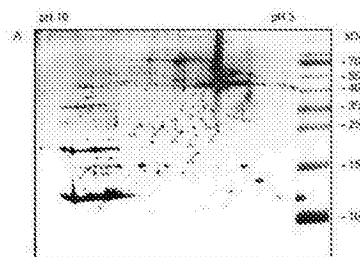
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其应用方法

(57)摘要

本发明公开了一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其在人前列腺自身抗体检测中的应用。本发明提供的制备人前列腺免疫优势抗原方法包括：(1)人前列腺组织蛋白提纯液的制备；(2)抗人前列腺组织抗原抗血清的制备及抗体效价检测；(3)人前列腺免疫优势抗原的鉴定；(4)人前列腺免疫优势抗原的纯化。是基于用正常人前列腺组织免疫家兔，利用家兔只对前列腺特异抗原发生免疫反应，而对家兔和人共有的抗原并不发生免疫反应的原理，从而获得特异的兔抗血清；将兔抗血清免疫球蛋白纯化后，利用层析柱从人前列腺组织获得纯化的人前列腺免疫优势抗原；以此免疫优势抗原作为包被抗原，建立检测人前列腺自身抗体的酶联免疫吸附分析法。



1. 一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

- (1) 人前列腺组织蛋白提纯液的制备;
- (2) 抗人前列腺组织抗原抗血清的制备及抗体效价检测;
- (3) 人前列腺免疫优势抗原的鉴定;
- (4) 人前列腺免疫优势抗原的纯化。

2. 根据权利要求1所述的人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:所述人前列腺组织蛋白提纯液的制备,包括以下步骤:

将人前列腺良性增生组织置于冰磷酸盐缓冲液中,修剪掉多余的组织,所述多余组织包括脂肪、膀胱;

清洗5次,剪碎前列腺组织,加入含0.5% TritonX-100的生理盐水,冰浴匀浆,12000r/min 4℃离心30min后,去除上层脂肪组织,获得的上清液即为人前列腺组织蛋白提纯液,测定总蛋白浓度后分装保存。

3. 根据权利要求1所述的人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:所述抗人前列腺组织抗原抗血清的制备,包括以下步骤:

弗氏完全佐剂乳化步骤(1)获得的人前列腺组织蛋白提纯液,对实验兔通过后背皮内及皮下多点注射弗氏完全佐剂乳化的人前列腺组织蛋白提纯液,蛋白浓度为0.5mg/ml,每只实验兔1ml;对照兔通过后背皮内及皮下多点注射弗氏完全佐剂乳化的生理盐水,每只1ml;

实验兔和对照兔在第10、20、30天再次接受注射,最后一次注射后7天处死实验兔和对照兔,并收集实验兔和对照兔的所有血液,离心分离血清,血清冻存于-80℃备用。

4. 根据权利要求3所述的人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:所述抗体效价检测通过酶联免疫吸附分析法检测,兔血清抗人前列腺组织蛋白抗体效价为1:10000以上。

5. 根据权利要求1所述的人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:所述人前列腺免疫优势抗原的鉴定,包括以下步骤:

首先将步骤(1)获得的人前列腺组织蛋白提纯液进行二维电泳,然后分别用步骤(2)获得的实验兔抗血清和对照兔血清进行免疫印迹,再对两者的差异蛋白点进行质谱分析,得所述人前列腺免疫优势抗原。

6. 根据权利要求5所述的人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:所述人前列腺免疫优势抗原包括Semaphorin-7A、热休克蛋白beta-1和主要组织相容性复合物2类抗原。

7. 根据权利要求1所述的人前列腺免疫优势抗原的制备方法,其特征在于:所述人前列腺免疫优势抗原的纯化,包括以下步骤:依次用饱和硫酸铵沉淀法和Protein A-Agarose层析柱从兔抗血清中纯化出兔免疫球蛋白,然后将其交联至CNBr活化的Sephrose层析柱上,将人前列腺组织蛋白提纯液过此层析柱,通过结合和洗脱即可获得纯化的人前列腺免疫优势抗原。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的人前列腺免疫优势抗原的应用方法,其特征在于:包括以下步骤:

纯化的人前列腺免疫优势抗原包被聚苯乙烯酶标板,每孔包被人前列腺免疫优势抗原

50ng,血清样本以1:10稀释后加样,辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG为二抗;用TMB显色液显色10min,2mol/L硫酸终止反应。

9.根据权利要求8所述的人前列腺免疫优势抗原的应用方法,其特征在于:将健康男性血清和/或慢性前列腺炎或慢性盆腔疼痛综合征患者血清采用人前列腺自身抗体的ELISA检测法进行检测。

一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其应用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物学检测技术领域,具体地,涉及一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其在人前列腺自身抗体检测中的应用。

背景技术

[0002] 前列腺炎是泌尿科常见的疾病,也是一个主要的医学问题,据估计影响30%的男性,慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征(CP/CPPS)约占所有前列腺炎的90%,是50岁以下男性最常见的泌尿科诊断。缺乏感染下的会阴、直肠、前列腺、阴茎、睾丸和腹部疼痛以及炎症为CP/CPPS患者的标志。CP/CPPS的病因尚不清楚,治疗效果有限。一般认为,CP/CPPS的症状可能是心理因素、免疫、神经和内分泌系统功能障碍之间相互影响的结果,其可能与自身免疫过程有关。

[0003] 在过去30年里,大量的工作一直在建立和定性实验性自身免疫性前列腺炎不同啮齿类动物模型,以研究CPPS的可能病理机制。这些模型证实前列腺提取物免疫大鼠或小鼠可以诱导对前列腺抗原的T细胞和抗体应答,其与前列腺炎的组织学证据相关。但选择不同鼠龄的大鼠有可能产生不同的结果;而且,大鼠或小鼠鼠系的不同,对自身前列腺抗原的细胞和体液应答能力和强度也不同。因此,动物模型实验有可能低估了前列腺炎的体液自身免疫性应答。在男性中有关自身免疫性前列腺炎的证据极少。大部分研究显示,CP/CPPS患者血清或精浆中有高水平的炎症相关的细胞因子,如IL-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-13、TNF- α 、IFN γ 、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、血小板源生长因子BB(PDGF-BB)等。少部分研究用前列腺来源的特异物质如前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺类固醇结合蛋白(PSBP)、PSA免疫大鼠,成功诱导产生了显著的前列腺炎,从而认为CPPS与自身免疫相关。但细胞因子的升高对自身免疫性前列腺炎的诊断缺乏特异性,而已知的几种前列腺特异蛋白对动物的成功免疫难以证实临床上自身免疫性前列腺炎患者的存在,且前列腺患者自身抗原的种类较多。但如果在患者血清中证实有抗人前列腺免疫优势抗原的自身抗体的存在则可确定男性可发生自身免疫性前列腺炎

发明内容

[0004] 发明目的:为了实现上述目的,本发明提供了一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其在人前列腺自身抗体检测中的应用。

[0005] 技术方案即:(1)人前列腺组织蛋白提纯液的制备:将获取的人前列腺良性增生组织置于冰磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01mmol/L,pH7.4)中,修剪掉脂肪、膀胱等多余的组织,再清洗5次,剪碎前列腺组织,加入含0.5%TritonX-100的生理盐水,冰浴匀浆,12000r/min 4℃离心30min后,去除上层脂肪组织,获得的上清液即为人前列腺组织蛋白提纯液,用全自动分析仪测定其总蛋白浓度后分装保存(-80℃)。

[0006] (2)抗人前列腺组织抗原抗血清的制备及抗体效价检测:首先对实验兔通过后背皮内及皮下多点注射弗氏完全佐剂乳化的步骤(1)获得的人前列腺组织蛋白提纯液(蛋白

浓度为0.5mg/ml),每只实验兔1ml;对照兔注射弗氏完全佐剂乳化的生理盐水,每只1ml。家兔在第10、20、30天再次进行注射,最后一次注射后7天处死家兔,并收集家兔的所有血液,离心分离血清,血清冻存于-80℃备用。兔血清抗前列腺组织蛋白抗体效价通过ELISA法检测,其效价为1:10000以上。

[0007] (3) 人前列腺免疫优势抗原的鉴定:首先将步骤(1)获得的人前列腺组织蛋白提纯液进行二维电泳,然后分别用步骤(2)获得的实验兔抗血清和对照兔血清进行免疫印迹,再对两者的差异蛋白点进行质谱分析,共鉴定出16种前列腺免疫优势抗原,其中3种蛋白——Semaphorin-7A、热休克蛋白beta-1和主要组织相容性复合物2类抗原已被证实与前列腺疾病相关。Western印迹确定这些抗原主要存在于前列腺腺体上皮细胞的细胞膜和细胞质上。

[0008] (4) 人前列腺免疫优势抗原的纯化:依次用饱和硫酸铵法和Protein A-Agarose层析柱从兔抗血清中纯化出兔免疫球蛋白,然后将其交联至CNBr活化的Sephacrose层析柱上,将人前列腺组织蛋白提纯液过此层析柱,通过结合和洗脱即可获得纯化的人前列腺免疫优势抗原。

[0009] (5) 建立检测人前列腺自身抗体的ELISA法:将步骤(4)获得的纯化的人前列腺免疫优势抗原包被聚苯乙烯酶标板(板条),每孔包被入前列腺免疫优势抗原50ng,血清样本以1:10稀释后加样,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人IgG为二抗。用TMB显色液显色10min,2mol/L硫酸终止反应。以 $P/N \geq 2.1$ 判断结果为阳性,从而建立人前列腺自身抗体的ELISA检测法。

[0010] 其中,设标准阳性血清为阳性对照,设正常健康男性血清为阴性对照,磷酸盐缓冲液为空白对照。

[0011] $P/N = (\text{标本OD值} - \text{空白对照OD值}) / (\text{阴性对照OD值} - \text{空白对照OD值})$ 。 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $1.5 \leq P/N < 2.1$ 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性。

[0012] (6) 人前列腺自身抗体检测法的临床应用:用步骤(5)建立的人前列腺自身抗体ELISA法,分别检测75例健康对照男性血清和78例慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征(CP/CPPS)患者血清,前者有2例抗前列腺自身抗体呈弱阳性,阳性率为2.7%,而后者有18例阳性,阳性率为23.1%。阳性患者血清用Western印迹证实,其可与人前列腺免疫优势抗原形成明显的反应带,证实CP/CPPS患者血清中确实存在能与人前列腺免疫优势抗原结合的自身抗体,证明本发明提供的人前列腺自身抗体检测法的可靠性。

[0013] 有益效果:本发明提供的制备人前列腺免疫优势抗原方法是基于用正常人前列腺组织免疫家兔,利用家兔只对前列腺特异抗原发生免疫反应,而对家兔和人共有的抗原并不发生免疫反应的原理,从而获得特异的兔抗血清;将兔抗血清免疫球蛋白纯化后,利用层析柱从人前列腺组织获得纯化的人前列腺免疫优势抗原;以此免疫优势抗原作为包被抗原,建立检测人前列腺自身抗体的酶联免疫吸附分析法(ELISA法),并将其应用于临床的检测。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0015] (1) 通过免疫家兔可以去除绝大部分前列腺组织匀浆中存在的人和兔共同抗原,而产生的抗体主要针对人前列腺免疫优势抗原。

[0016] (2) 通过二维电泳和免疫印迹的差异显示,共鉴定出16种人前列腺免疫优势抗原,通过免疫组化发现这些免疫优势抗原主要存在于前列腺腺体上皮细胞的细胞膜和细胞质

中。

[0017] (3) 通过亲和层析的方法纯化获得了人前列腺免疫优势抗原,并以此作为包被抗原建立了人前列腺自身抗体的ELISA检测法。

[0018] (4) 通过人前列腺自身抗体ELISA检测法在CP/CPPS患者血清中检测出抗前列腺自身抗体,并被Western印迹所证实,从而为临床上男性自身免疫性前列腺炎的诊断和治疗监测提供了新的手段。

附图说明

[0019] 附图1为人前列腺组织蛋白提纯液的二维电泳及差异蛋白点示意图,其中A为二维电泳凝胶的银染图片,B和C分别为实验兔抗血清和对照兔血清的Western印迹结果;

[0020] 附图2为人前列腺组织免疫优势抗原的免疫组化分析,其中A和B分别为实验兔抗血清和对照兔血清的免疫组化结果;

[0021] 附图3为人前列腺免疫优势抗原的纯化及SDS-PAGE验证,其中A为实验兔抗血清IgG的洗脱曲线,B为人前列腺免疫优势抗原的洗脱曲线,C为SDS-PAGE验证纯化效果;

[0022] 附图4为Western印迹证实CP/CPPS患者血清中存在抗人前列腺免疫优势抗原的自身抗体,左图和右图分别为CP/CPPS患者抗前列腺自身抗体阳性血清和健康男性血清的Western印迹结果。

具体实施方式

[0023] 下面将通过几个具体实施例,进一步阐明本发明,这些实施例只是为了说明问题,并不是一种限制。

[0024] 实施例1

[0025] 人前列腺组织蛋白提纯液的制备:人前列腺良性增生组织由南京军区南京总医院泌尿外科提供,来自5例良性前列腺增生患者。本研究得到医院伦理委员会批准,并获患者知情同意。将获取的前列腺组织置于冰PBS (0.01mmol/L,pH7.4) 中,修剪掉脂肪、膀胱等多余的组织,再清洗5次,剪碎前列腺组织,加入含0.5% TritonX-100的生理盐水,冰浴匀浆,12000r/min 4℃离心30min后,去除上层的脂肪组织,留取上清液即为人前列腺组织蛋白提纯液,用全自动生化分析仪测定其总蛋白浓度后分装保存(-80℃)。

[0026] 实施例2

[0027] 抗人前列腺组织抗原抗血清的制备:实验兔方案通过动物委员会以及伦理委员会的批准。实验兔通过后背皮内及皮下多点注射弗氏完全佐剂乳化的实施例1中获得的人前列腺组织蛋白提纯液(蛋白浓度为0.5mg/ml),每只实验兔1ml;对照兔注射弗氏完全佐剂乳化的生理盐水,每只1ml。家兔在第10、20、30天再次接受注射,最后一次注射后7天处死家兔,并收集家兔的所有血液,离心分离血清,血清冻存于-80℃备用。免疫家兔制备抗血清成功与否,通过ELISA法检测其兔血清中所含特异性抗体的效价进行评估。

[0028] 实施例3

[0029] 实验兔血清抗体效价的检测:实验兔血清抗前列腺组织蛋白抗体效价通过常规ELISA法检测。用人前列腺蛋白匀浆包被96孔酶标板,每孔50ng蛋白。待检血清按1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000梯度稀释。HRP标记的羊抗兔IgG多克隆抗体作为二抗(1:

1000稀释),用TMB显色液显色10min,2mol/L硫酸终止反应。以实验兔血清的吸光度值/对照兔血清的吸光度值 ≥ 2.1 作为阳性判断标准,结果显示,实验兔血清的抗体效价大于1:10000。

[0030] 实施例4

[0031] 人前列腺免疫优势抗原的鉴定:将实施例1中获得的人前列腺组织蛋白提纯液(蛋白含量为500 μ g)在Ettan 1PGphor 3Isoelectric Focusing Unit上进行等电聚焦(IEF)电泳,用13cm固定pH梯度的条带(pH3-10)。上样缓冲液为1PG缓冲液(pH3-10),其组成包括8mol/L尿素、2% (g/mL) 3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲基氨基]-1-丙磺酸、20mmol二硫苏糖醇、0.001%溴酚蓝。等电聚焦电压使用线性斜坡模式。第一向电泳后的条带在10ml平衡溶液中室温平衡15min,再在含2.5% (重量/体积) 碘乙酰胺的平衡溶液中平衡15min。第二向电泳在12.5%的SDS凝胶上进行,使用Ettan DALRtwelve GEL System电泳仪,在前30min使用5W每块凝胶的功率,在后6~7h使用12W每块凝胶的功率,直至最后溴酚蓝线跑至凝胶底部。共制备3张凝胶进行电泳,1张凝胶根据常规方案进行硝酸银染色,另2张凝胶用于Western印迹。

[0032] 另2张凝胶分别用实施例2中获得的实验兔抗血清和对照兔血清作为一抗(1:1稀释)进行Western印迹,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔作为二抗(1:1000稀释),TMB显色液显色。染色凝胶以300dpi的分辨率扫描(Artix Scan 1010plus),并用图像分析软件(Image Master™ 2D platinum software,Version 5.0)对蛋白点进行检测、量化、比对和数据分析,质谱分析用Flex Analysis v.2.4软件进行,最终获得差异优势蛋白16种,即为人前列腺免疫优势抗原。具体结果如附图1和附表1所示。

[0033] 附表1 Western印迹和质谱分析鉴定的16种免疫优势抗原

[0034]

Spot ID	International protein index (accession no.)	Protein name	Sequence coverage (%)	Comparison of absorbance	Mr/PI
3	gi 229959	Chain B, refined crystal structure of deoxyhemoglobin	95%	1.16647:0	15941/7.26
6	gi 37727667	Transformation-related protein 2	42%	0.652712:0	49168/5.26
20	gi 90108664	Chain A, crystal structure of lipid-free human apolipoprotein A-I	43%	0.680427:0	28061/5.27
21	gi 225637520	Semaphorin-7A isoform 2 preproprotein	28%	0.813498:0	74344/7.11
22	gi 16418441	Deoxynucleotidyl transferase terminal-interacting protein 1	54%	2.29072:1.299	37275/9.11
23	gi 4504517	Heat shock protein beta-1	38%	0.697419:0	22768/5.98
33	gi 60593459	Chain A, crystal structure analysis of the human Tub protein (isoform A) spanning residues 289 through 561	46%	0.579691:0	30967/8.58
34	gi 100913211	Heat shock factor protein 4 isoform a	48%	0.447345:0	49921/6.23
35	gi 342350777	Chain A, human annexin V with incorporated methionine analogue azidohomocysteine	24%	1.43063:0	35811/4.89
39	gi 39578331	MHC class II antigen	70%	1.15704:0	10799/6.34
61	gi 315570273	Actin, gamma-enteric smooth muscle isoform 2 precursor	50%	1.16337:0	37459/5.36
62	gi 302148673	Chain A, the crystal structure of phosphorylated Irf-3	37%	0.55656:0	27087/5.15
189	gi 32189392	Peroxiredoxin-2	44%	0.96491:0.301322	22049/5.66
196	gi 144853481	VWA3A protein, partial	34%	0.84156:0.26079	89885/9.21
199	gi 7769665	Cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1	68%	0.990437:0.419737	22314/6.54
200	gi 6425025	Beta-globin	83%	0.682455:0.34707	6656/5.04

[0035] 为了进一步明确人前列腺免疫优势抗原在前列腺组织中的定位,取良性前列腺增生组织进行福尔马林固定和石蜡包埋,二甲苯中脱蜡,使其再生成水化物,在95℃下用抗原修复液EDTA处理13min,并冷却50min,用1%BSA溶液封闭。组织切片分别与实验兔抗血清和对照兔血清4℃孵育过夜,用含0.1%吐温的PBS溶液清洗5次,并在辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体中室温孵育30min。BAD显色剂显色,苏木精复染。免疫组化图片用1X73显微镜观察。具体结果如附图2所示。

[0036] 实施例5

[0037] 人前列腺免疫优势抗原的纯化:首先用饱和硫酸铵沉淀法纯化出实施例2中获得的实验兔抗血清球蛋白,再使用Protein A-Agarose层析柱纯化出实验兔抗血清球蛋白中的IgG。使用含1.5mol/L甘氨酸的pH4.0的PBS溶液对IgG进行洗脱,并用1mol/L pH8.5Tris-HCl缓冲液以中和洗脱缓冲液防止抗体失活。然后,将纯化后的IgG与CNBr激活的Sepharose交联,再用交联后的Sepharose-IgG在层析柱内对实施例1中获得的人前列腺组织蛋白提纯液中的免疫优势抗原进行纯化,即可获得纯化的人前列腺免疫优势抗原。SDS-PAGE电泳进一步证实了纯化的效果。结果如附图3所示。

[0038] 实施例6

[0039] 人前列腺自身抗体检测方法的建立:建立人前列腺自身抗体检测的ELISA法,即将实施例5中获得的纯化人前列腺免疫优势抗原包被聚苯乙烯微孔板,每孔50ng免疫优势抗原,血清样本以1:10稀释后加样,HRP标记的羊抗人IgG为二抗。用TMB显色液显色10min,2mol/L硫酸终止反应。以 $P/N \geq 2.1$ 判断结果为阳性。其中,设标准阳性血清为阳性对照,设正常健康男性血清为阴性对照,磷酸盐缓冲液为空白对照。

[0040] $P/N = (\text{标本OD值} - \text{空白对照OD值}) / (\text{阴性对照OD值} - \text{空白对照OD值})$ 。 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $1.5 \leq P/N < 2.1$ 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性。

[0041] 实施例7

[0042] 人前列腺自身抗体检测法的临床应用:收集临床上NIH慢性前列腺炎症状指数评分(NIH-CPS1) ≥ 10 分的CP/CPPS患者78例,年龄30~45岁。同时收集无前列腺炎临床症状的健康男性志愿者75例,年龄27~37岁。两组研究对象均于早晨空腹采集静脉血,分离血清备用。患者血清和健康男性血清采用实施例6中人前列腺自身抗体检测方法(ELISA法)检测。

[0043] 75例健康对照男性血清中有2例抗前列腺自身抗体呈弱阳性,阳性率为2.7%,而78例慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征(CP/CPPS)患者血清中18例抗前列腺自身抗体阳性,阳性率为23.1%。阳性患者血清用Western印迹证实,其可与人前列腺免疫优势抗原形成明显的反应带,如附图4所示,证实CP/CPPS患者血清中确实存在能与人前列腺免疫优势抗原发生反应的自身抗体。

[0044] 以上所述仅是发明的几个实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离发明原理的前提下,还可以做出若干改进,这些改进也应视为本发明的保护范围。

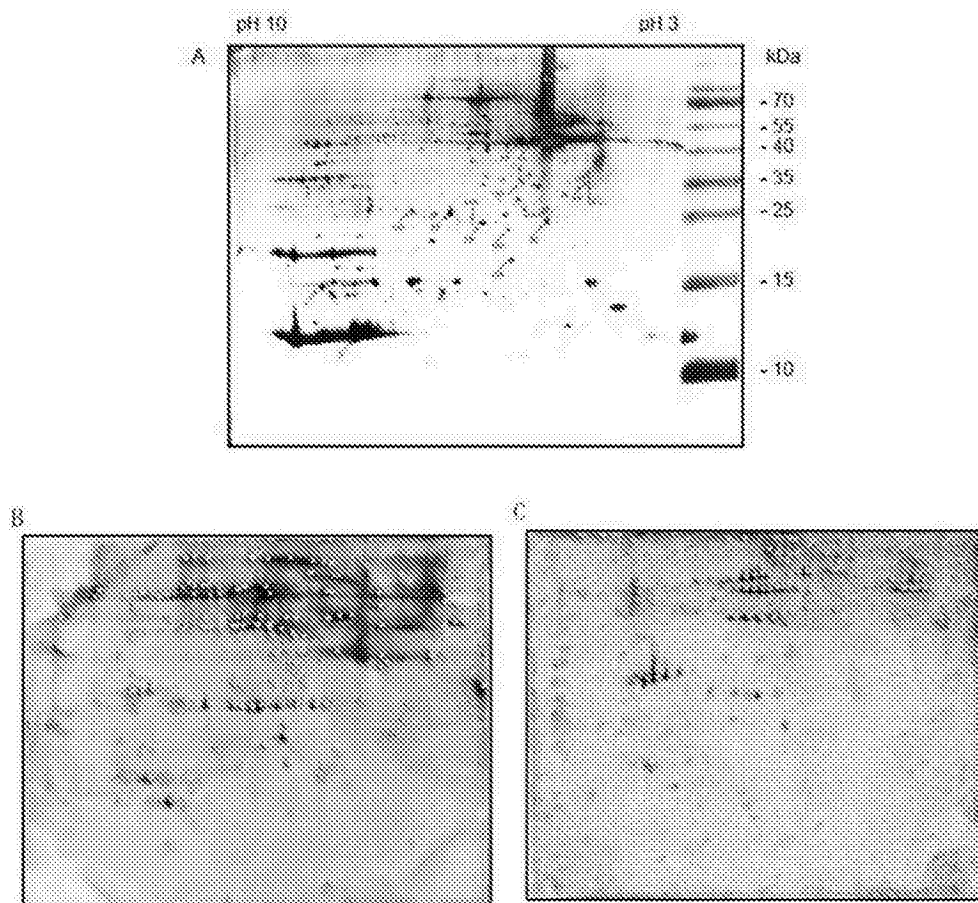


图1

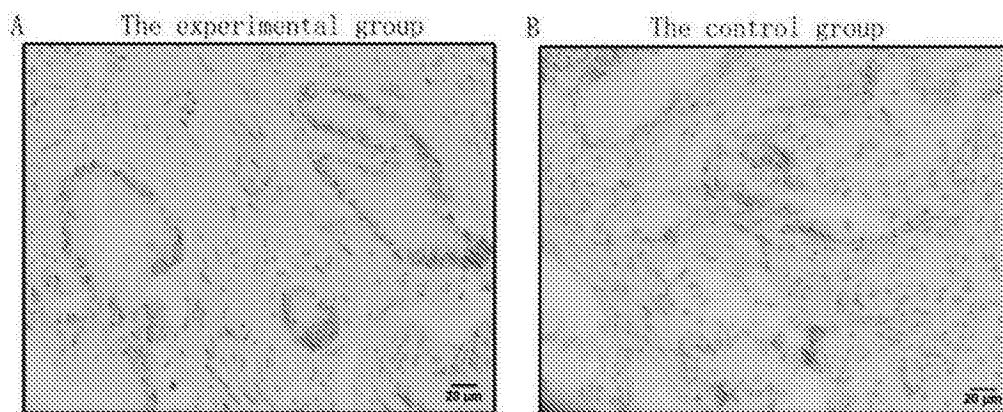


图2

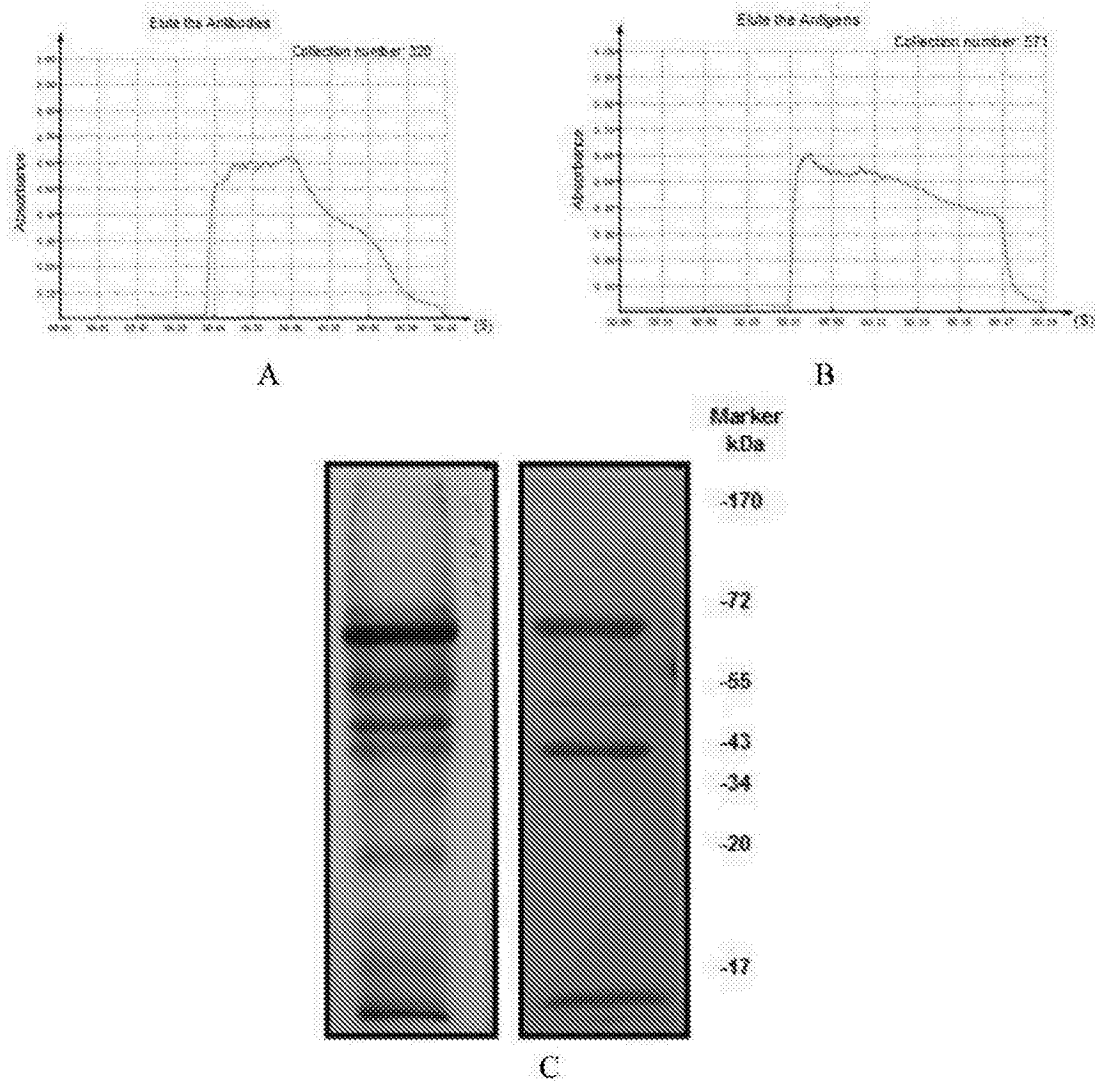


图3

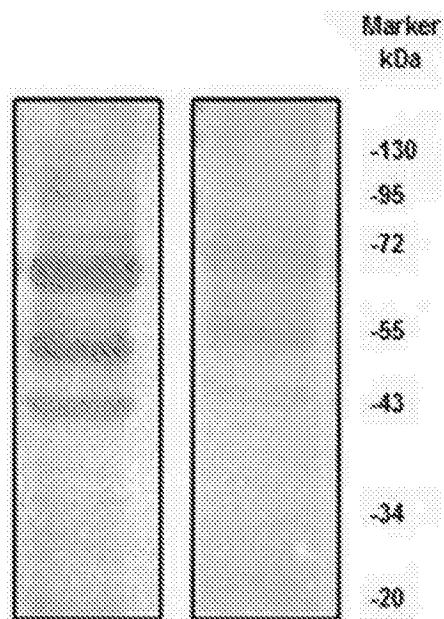


图4

专利名称(译)	一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其应用方法		
公开(公告)号	CN107522780A	公开(公告)日	2017-12-29
申请号	CN201710944582.2	申请日	2017-10-12
[标]发明人	陆金春		
发明人	陆金春		
IPC分类号	C07K14/705 C07K14/47 G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/70539 C07K14/70596 G01N33/535 G01N33/68 G01N2800/342		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人前列腺免疫优势抗原的制备方法及其在人前列腺自身抗体检测中的应用。本发明提供的制备人前列腺免疫优势抗原方法包括：(1)人前列腺组织蛋白提纯液的制备；(2)抗人前列腺组织抗原抗血清的制备及抗体效价检测；(3)人前列腺免疫优势抗原的鉴定；(4)人前列腺免疫优势抗原的纯化。是基于用正常人前列腺组织免疫家兔，利用家兔只对前列腺特异抗原发生免疫反应，而对家兔和人共有的抗原并不发生免疫反应的原理，从而获得特异的兔抗血清；将兔抗血清免疫球蛋白纯化后，利用层析柱从人前列腺组织获得纯化的人前列腺免疫优势抗原；以此免疫优势抗原作为包被抗原，建立检测人前列腺自身抗体的酶联免疫吸附分析法。

