



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152503 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711375909.5

(22)申请日 2017.12.19

(71)申请人 上海澜帆实业有限公司

地址 200333 上海市嘉定区安亭镇新源路
66弄21号802室

(72)发明人 邹永龙 马欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/66(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒
及其操作流程

(57)摘要

本发明公开了一种酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程,酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒包括盒体、靶标分子及试剂,所述试剂盒是一种基于酶联免疫斑点印迹与富集相结合的技术,用于检测自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的试剂盒。酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒的操作流程包括制备靶标分子、制备靶标分子的覆被装置、制备细胞裂解液、制备抗人免疫细胞抗体及免疫细胞富集、制备扩增培养基、检测靶标分子及临床样品检测数据分析。本发明是一种免疫细胞富集技术结合具有高灵敏度和高特异性的酶联免疫斑点印迹技术,及对相应的靶标分子的精准分析,使得对的检测特异性升高和假阳性几率降低。

1. 酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程, 一种基于酶联免疫斑点印迹技术的自身免疫检测试剂盒包括盒体、靶标分子及试剂, 其特征在于: 所述试剂盒是一种基于酶联免疫斑点印迹与富集相结合的技术, 用于检测自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的试剂盒, 所述靶标分子是抗原 (ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A) 纯化后的多肽经过标定以后, 稀释至20-100微克每毫升以后, 被铺被到96孔的PVDF膜上, 然后用牛血清蛋白作封闭处理, 最后经过特殊干燥工艺和真空封膜处理后可长期保存, 所述试剂包括细胞裂解液、抗人免疫细胞抗体、免疫细胞富集及扩增培养基, 所述细胞裂解液主要成分是HEPES0.1-0.3M, 氯化铝0.15-0.3M, EDTA钾0.1-0.4M, 碳酸钾0.2-0.4M, 0.35-0.6M甘油等, 所述抗人免疫细胞抗体是通过从山羊或小鼠制备的抗人免疫细胞抗体, 所述扩增培养基一种用于免疫细胞上, 使其增加细胞生长和刺激因子的RPMI1640扩增培养基;

酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程, 包括以下几个操作流程:

1) 制备靶标分子: 经筛选选定的靶标分子 (ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A), 通过序列分析, 选定了抗体由100-200个氨基酸组成的多肽, 通过分子克隆和大肠杆菌表达的方式来表达这些多肽。通过分子复性的技术手段使得这些多肽得以分离纯化, 经由上述过程纯化后的多肽经过脱盐处理, 保存于磷酸缓冲液内置于-20℃长期保存。

2) 制备靶标分子的覆被装置: 在流程1) 的基础之上, 将 (ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A) 纯化后的多肽经过标定以后, 稀释至20-100微克每毫升以后, 被铺被到96孔的PVDF膜上, 然后用牛血清蛋白作封闭处理, 最后经过特殊干燥工艺和真空封膜处理后可长期保存。

3) 制备细胞裂解液: 细胞裂解液主要成分是HEPES0.1-0.3M, 氯化铝0.15-0.3M, EDTA钾0.1-0.4M, 碳酸钾0.2-0.4M, 0.35-0.6M甘油等。使用前用无菌纯净水稀释该细胞裂解液1:10, 于室温避光存放, 人血液用含肝素钠或EDTA的无菌管新鲜采集, 先离心3分钟去除血浆, 然后加入3毫升细胞裂解液, 震荡混匀于室温处理15分钟, 离心收集白细胞部分, 用细胞清洗液0.1-0.2MPBS洗涤一次后备用。

4) 制备抗人免疫细胞抗体及免疫细胞富集: 此制剂是通过从山羊或小鼠制备的抗人免疫细胞抗体, 向每一个分离的外周血细胞加入5微升该抗体制剂, 混匀后在冰上放置15分钟, 然后加入经特异修饰过的磁珠吸附这些免疫细胞, 在缓冲液清洗以后, 特异性的免疫细胞通过磁性有效分离得以富集和浓缩。

5) 制备扩增培养基: 经过添加特殊生长因子和化合物后制成的扩增培养液 (RPMI1640) 可以有效激活相关免疫细胞的复制和自体免疫蛋白的合成和分泌过程, 从而大幅度提高微量自体免疫蛋白的被检测概率和灵敏度。

6) 检测靶标分子: 经分离浓缩后的免疫细胞使用细胞扩增培养液悬浮以后被均匀分布到每一个96孔里, 于二氧化碳培养箱内培养18-20小时以后取出。PVDF膜经过含去垢剂的磷酸缓冲液清洗数次以后, 于每一96孔内加入试剂盒一抗孵育2小时。经清洗后, 于每一96孔内加入试剂盒二抗孵育0.5小时。经清洗后, 加入显色试剂后孵育0.5-1小时。终止显色反应, 清洗和干燥处理以后, 使用ELISPOT实验读板机和软件分析实验数据。

7) 临床样品检测数据分析: 自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的靶标分子的分析测定及阴性, 弱阳性, 强阳性, 假阳性结果的检测与数据分析。

酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程

技术领域

[0001] 本发明涉及1型糖尿病的特异性辅助诊断技术领域,具体是一种酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程。

背景技术

[0002] 糖尿病是现今威胁人类健康最严重的疾病之一,根据世界卫生组织的报告,全球18岁以上成人糖尿病患病率从1980年的4.7%增加到2014年的8.5%。近年来随着生活条件的改善,中国的糖尿病患病也逐年递增,总患病人数已经接近一亿。尤其在某些相对发达的地区除发病人数逐年上升,还呈现出年轻化的趋势。

[0003] 糖尿病是一种以高血糖(空腹血糖高于7.0毫摩尔/升)为特征的代谢性疾病。高血糖则是由于胰岛素分泌缺陷或其生物活性作用受损,或两者兼有引起。糖尿病可由遗传或环境单独或者共同作用而致病。临床表现为多饮、多尿、多食和消瘦(三多一少)的主要是1型糖尿病。而疲乏无力,肥胖多是2型糖尿病的症状。糖尿病对患者健康的危害主要是因为体内长时间的高血糖环境导致各种组织,如眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害甚至功能丧失。有数据显示2012年有220万例死亡可归咎于糖尿病,而在2015年,糖尿病直接造成160万例死亡,世界卫生组织由此推测到糖尿病将成为第七位主要死因。

[0004] 1型糖尿病发病年龄轻,大多低于30岁,起病突然,不少患者以酮症酸中毒为首发症状,血清胰岛素和C肽水平低下,ICA、IAA或GAD抗体可呈阳性。致病的因素很多包括受污染的自然和生活环境、自身因素如遗传缺陷和病毒感染等。与2型糖尿病的发病机理完全不同,1型糖尿病主要是由于自体免疫系统攻击并最终杀死体内所有产生胰岛素的胰岛β细胞引起的。通过免疫检测手段已经确认超过98%的1型糖尿病病人体内可以找到至少一种自身免疫抗体。

[0005] 因此,在现有技术中,检测特异性差、假阳性几率高及精准度差等问题,设计一种酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程,是目前需要解决的技术问题。

发明内容

[0006] 发明目的:针对现有技术的缺陷和不足,解决存在检测特异性差、假阳性几率高及精准度差等问题,申请人经过多次实践改进,设计了一种酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程。

[0007] 技术方案:为了实现上述发明目的,本发明提供了酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程,酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒包括盒体、靶标分子及试剂,所述试剂盒是一种基于酶联免疫斑点印迹与富集相结合的技术,用于检测自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的试剂盒。

[0008] 所述靶标分子是抗原(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A)纯化后的多肽经过标定以后,稀释至20-100微克每毫升以后,被铺被到96孔的PVDF膜上,然后用牛血清蛋白作封闭处理,最后经过特殊干燥工艺和真空封膜处理后可长期保存,所述试剂包括细胞裂解液、抗

人免疫细胞抗体、免疫细胞富集及扩增培养基,所述细胞裂解液主要成分是HEPES0.1-0.3M,氯化铝0.15-0.3M,EDTA钾0.1-0.4M,碳酸钾0.2-0.4M,0.35-0.6M甘油等,所述抗人免疫细胞抗体是通过从山羊或小鼠制备的抗人免疫细胞抗体,所述扩增培养基一种用于免疫细胞上,使其增加细胞生长和刺激因子的RPMI1640扩增培养基;

[0009] 酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程,包括以下几个操作流程:

[0010] 制备靶标分子:经筛选选定的靶标分子(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A),通过序列分析,选定了抗体由100-200个氨基酸组成的多肽,通过分子克隆和大肠杆菌表达的方式来表达这些多肽。通过分子复性的技术手段使得这些多肽得以分离纯化,经由上述过程纯化后的多肽经过脱盐处理,保存于磷酸缓冲液内置于-20℃长期保存。

[0011] 制备靶标分子的覆被装置:在流程1)的基础之上,将(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A)纯化后的多肽经过标定以后,稀释至20-100微克每毫升以后,被铺被到96孔的PVDF膜上,然后用牛血清蛋白作封闭处理,最后经过特殊干燥工艺和真空封膜处理后可长期保存。

[0012] 细胞裂解液:细胞裂解液主要成分是HEPES0.1-0.3M,氯化铝0.15-0.3M,EDTA钾0.1-0.4M,碳酸钾0.2-0.4M,0.35-0.6M甘油等。使用前用无菌纯净水稀释该细胞裂解液1:10,于室温避光存放,人血液用含肝素钠或EDTA的无菌管新鲜采集,先离心3分钟去除血浆,然后加入3毫升细胞裂解液,震荡混匀于室温处理15分钟,离心收集白细胞部分,用细胞清洗液0.1-0.2M PBS洗涤一次后备用。

[0013] 制备抗人免疫细胞抗体及免疫细胞富集:此制剂是通过从山羊或小鼠制备的抗人免疫细胞抗体,向每一个分离的外周血细胞加入5微升该抗体制剂,混匀后在冰上放置15分钟,然后加入经特异修饰过的磁珠吸附这些免疫细胞,在缓冲液清洗以后,特异性的免疫细胞通过磁性有效分离得以富集和浓缩。

[0014] 制备扩增培养基:经过添加特殊生长因子和化合物后制成的扩增培养液(RPMI1640)可以有效激活相关免疫细胞的复制和自体免疫蛋白的合成和分泌过程,从而大幅度提高微量自体免疫蛋白的被检测概率和灵敏度。

[0015] 检测靶标分子:经分离浓缩后的免疫细胞使用细胞扩增培养液悬浮以后被均匀分布到每一个96孔里,于二氧化碳培养箱内培养18-20小时以后取出。PVDF膜经过含去垢剂的磷酸缓冲液清洗数次以后,于每一96孔内加入试剂盒一抗孵育2小时。经清洗后,于每一96孔内加入试剂盒二抗孵育0.5小时。经清洗后,加入显色试剂后孵育0.5-1小时。终止显色反应,清洗和干燥处理以后,使用ELISPOT实验读板机和软件分析实验数据。

[0016] 临床样品检测数据分析:自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的靶标分子的分析测定及阴性,弱阳性,强阳性,假阳性结果的检测与数据分析。

[0017] 有益效果:本发明与现有技术相比,其有益效果是:

[0018] 1、本发明通过自身抗体对以上抗原(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A)进行探测,使得对的检测特异性升高和假阳性几率降低。

[0019] 2、本发明是一种免疫细胞富集技术结合具有高灵敏度和高特异性的酶联免疫斑点印迹技术,及对相应的靶标分子的精准分析。

[0020] 3、本发明提供的试剂盒每次可同时检测多个标本,操作简便,是一种能满足中高

通量检测需要和具有高性价比来完成对自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常辅助诊断的方法。

具体实施方式

[0021] 下面通过一个最佳实施例,对本技术方案进行详细说明,但是本发明的保护范围不局限于所述实施例。

[0022] 基于酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程,酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒包括盒体、靶标分子及试剂,所述试剂盒是一种基于酶联免疫斑点印迹与富集相结合的技术,用于检测自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的试剂盒,所述靶标分子是抗原(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A)纯化后的多肽经过标定以后,稀释至20-100微克每毫升以后,被铺被到96孔的PVDF膜上,然后用牛血清蛋白作封闭处理,最后经过特殊干燥工艺和真空封膜处理后可长期保存,所述试剂包括细胞裂解液、抗人免疫细胞抗体、免疫细胞富集及扩增培养基,所述细胞裂解液主要成分是HEPES0.1-0.3M,氯化铝0.15-0.3M,EDTA钾0.1-0.4M,碳酸钾0.2-0.4M,0.35-0.6M甘油等,所述抗人免疫细胞抗体是通过从山羊或小鼠制备的抗人免疫细胞抗体,所述扩增培养基一种用于免疫细胞上,使其增加细胞生长和刺激因子的RPMI1640扩增培养基;

[0023] 酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程,包括以下几个操作流程:

[0024] 制备靶标分子:经筛选选定的靶标分子(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A),通过序列分析,选定了抗体由100-200个氨基酸组成的多肽,通过分子克隆和大肠杆菌表达的方式来表达这些多肽。通过分子复性的技术手段使得这些多肽得以分离纯化,经由上述过程纯化后的多肽经过脱盐处理,保存于磷酸缓冲液内置于-20℃长期保存。

[0025] 制备靶标分子的覆被装置:在流程1)的基础之上,将(ICA、IAA、GAD、PTPRN、1A-2A、ZnT8A)纯化后的多肽经过标定以后,稀释至20-100微克每毫升以后,被铺被到96孔的PVDF膜上,然后用牛血清蛋白作封闭处理,最后经过特殊干燥工艺和真空封膜处理后可长期保存。

[0026] 制备细胞裂解液:细胞裂解液主要成分是HEPES0.1-0.3M,氯化铝0.15-0.3M,EDTA钾0.1-0.4M,碳酸钾0.2-0.4M,0.35-0.6M甘油等。使用前用无菌纯净水稀释该细胞裂解液1:10,于室温避光存放,人血液用含肝素钠或EDTA的无菌管新鲜采集,先离心3分钟去除血浆,然后加入3毫升细胞裂解液,震荡混匀于室温处理15分钟,离心收集白细胞部分,用细胞清洗液0.1-0.2M PBS洗涤一次后备用。

[0027] 制备抗人免疫细胞抗体及免疫细胞富集:此制剂是通过从山羊或小鼠制备的抗人免疫细胞抗体,向每一个分离的外周血细胞加入5微升该抗体制剂,混匀后在冰上放置15分钟,然后加入经特异修饰过的磁珠吸附这些免疫细胞,在缓冲液清洗以后,特异性的免疫细胞通过磁性有效分离得以富集和浓缩。

[0028] 制备扩增培养基:经过添加特殊生长因子和化合物后制成的扩增培养液(RPMI1640)可以有效激活相关免疫细胞的复制和自体免疫蛋白的合成和分泌过程,从而大幅度提高微量自体免疫蛋白的被检测概率和灵敏度。

[0029] 检测靶标分子:经分离浓缩后的免疫细胞使用细胞扩增培养液悬浮以后被均匀分

布到每一个96孔里,于二氧化碳培养箱内培养18-20小时以后取出。PVDF膜经过含去垢剂的磷酸缓冲液清洗数次以后,于每一96孔内加入试剂盒一抗孵育2小时。经清洗后,于每一96孔内加入试剂盒二抗孵育0.5小时。经清洗后,加入显色试剂后孵育0.5-1小时。终止显色反应,清洗和干燥处理以后,使用ELISPOT实验读板机和软件分析实验数据。

[0030] 临床样品检测数据分析:自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的靶标分子的分析测定及阴性,弱阳性,强阳性,假阳性结果的检测与数据分析。

[0031] 1、对血糖的自身免疫的抗体的靶标分子的检测分析

[0032] 我们首先对制备的靶标分子进行了质控测定(测定结果见表1)。采用多肽分子铺被技术将靶标分子按优化后的浓度铺被到96孔板内,然后将5例特异的阳性病人血清样品经过稀释处理以后加入每一个96孔内。通过二抗抗体孵育和显色反应,得到如下表所示酶联活性结果。正常人血清也包括在这个实验中最后显示的是扣除正常人样品数值后的读数结果。该结果显示随着在病人的病程进展过程当中,自体胰岛素分泌的水平降低,我们选择的靶标分子阳性结果的出现率从2个指标变为所有指标阳性,阳性测定数值也呈现了一个反应强度从弱变强的过程。这些结果表明这靶标分子对血糖异常的病人的检测有一个从发病初期到发病后期的进程监视和诊断覆盖的良好效果。

[0033]

病人血样编号	胰岛素(标准国际单位)	检测的 OD 数值					
		ICA	IAA	GAD	PTPRN	1A-2A	ZnT8A
1	64	1.08	0.4	0	0	0	0
2	51	0	0	1.1	1.95	0.27	1.95
3	26	0.94	0.62	1.48	2.35	0.29	2.38
4	14	1.2	0.8	1.09	1.75	0.22	2.14
5	1.4	1.57	1	1.08	1.08	0.19	2.78

[0034] 表1

[0035] 2、临床样品收集和ELISPOT实验和结果

[0036] 38例具有临床特征的1型糖尿病、非1型糖尿疾病或者正常人的血液样品分别从上海和宁波等地收集。其中30例经过免疫细胞分离后曾进行冷冻存储和复融的步骤,另外8例是新鲜血经免疫细胞分离后直接进行测试。血液收集和免疫细胞分离的时间介于2017年3月至2017年8月间。38例样品也于同期分三次完成测试。实验测定期间,所有样品包括1型糖尿病确诊和疑似病例,无相关阴性血样都是采用双盲的方式对血样进行编号和测试。测试完成以后再比对实验测定结果和临床诊断的信息,最后对所有血样和测试结果的灵敏度和有效性进行分析。

[0037] 3、检测结果和综合指数(ELISPOT计数)分析

[0038] 我们随后对40例临床血样进行检测,对38例有效样本中的28例作出了和临床检验结果相符的1型糖尿病阳性或者阴性的检测结论,总体诊断检测的准确度为73.7%。其中对16例1型糖尿病血样检出了15例阳性结果,检出准确性达到93.7%。对9例2型糖尿病血样显

示检测结果为完全阴性的有6例,另外3例显示微弱阳性反应,随访调查显示这些病人都曾进行过胰岛素治疗,我们推测因为外源胰岛素的使用激发了病人自体的某些免疫反应,而这些免疫反应可以被我们的检测方法灵敏地检测到,这可以部分解释我们得到的阳性检测结果。

[0039] 临床样品测试检测结果概况(见表2):

总体准确度		1 型糖尿病		2 型糖尿病		内分泌类疾病		正常阴性样	
有效样品	38	临床阳性	16	有效样品	9	临床阴性	9	临床阴性	4
正确检测	28	结果阳性	15	结果阴性	6	结果阳性	6	结果阴性	4
准确率	73.7 0%	准确率	93.7 0%	弱阳性	3	结果阴性	3	结果阳性	无

[0041] 表2

[0042] 我们制备的靶标分子具有活性好,特异性强,存储方便,整个试剂盒的其它组份和实验操作流程都已经做过系统化的优化处理,通过上述不同批次实验的验证可以得知我们发明的这个试剂盒和检测方案具有操作简便易控,批次间差异较小,一致性和灵敏度都很高的技术优点。

[0043] 我们在该技术的研发过程中已经对核心的试剂进行来充分的优化和技术处理,所生产的试剂盒和相关试剂都具有易存储和操作的优点。我们已经根据相关临床结果拟定了初步的诊断技术参数,这为以后的辅助诊断提供了统计数据,可以进一步优化来降低假阳性率和提高该检测方法的准确度。

[0044] 通过对检测结果做进一步分析发现,我们对尤其是新发的病例都作出了完全准确的检测,这为下一步对自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常病更早期检测诊断提供了很大的可能。由于实验全程采用无菌操作,可以有效避免无关污染,减少了假阳性结果,准确性也会很高。

[0045] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程		
公开(公告)号	CN108152503A	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN2017111375909.5	申请日	2017-12-19
[标]发明人	邹永龙 马欣		
发明人	邹永龙 马欣		
IPC分类号	G01N33/66 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒及其操作流程，酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒包括盒体、靶标分子及试剂，所述试剂盒是一种基于酶联免疫斑点印迹与富集相结合的技术，用于检测自身免疫功能的缺陷导致的血糖异常的试剂盒。酶联免疫斑点印迹的自身免疫检测试剂盒的操作流程包括制备靶标分子、制备靶标分子的覆被装置、制备细胞裂解液、制备抗人免疫细胞抗体及免疫细胞富集、制备扩增培养基、检测靶标分子及临床样品检测数据分析。本发明是一种免疫细胞富集技术结合具有高灵敏度和高特异性的酶联免疫斑点印迹技术，及对相应的靶标分子的精准分析，使得对的检测特异性升高和假阳性几率降低。

病人血样编号	胰岛素(标准国际单位)	检测的 OD 数值					
		ICA	IAA	GAD	PTPRN	1A-2A	ZnT8A
1	64	1.08	0.4	0	0	0	0
2	51	0	0	1.1	1.95	0.27	1.95
3	26	0.94	0.62	1.48	2.35	0.29	2.38
4	14	1.2	0.8	1.09	1.75	0.22	2.14
5	1.4	1.57	1	1.08	1.08	0.19	2.78