



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105987996 A

(43) 申请公布日 2016. 10. 05

(21) 申请号 201510066294. 2

(22) 申请日 2015. 02. 09

(71) 申请人 东莞博捷生物科技有限公司

地址 523808 广东省东莞市松山湖新竹路 4  
号新竹苑 9 栋 2 楼

申请人 东莞中山大学研究院

广东中大南海海洋生物技术工程中心有限公司

(72) 发明人 徐安龙 张广献 梁东 荆琛峰

周靖宇 吴赞 张鸿运 覃伟恒

吴松青 严万两

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

### (54) 发明名称

一种检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒

### (57) 摘要

本发明提供一种定性检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒。该酶联免疫试剂盒包括：包被酿酒酵母细胞壁甘露聚糖抗原的酶标板、酶标抗体、底物显色液、浓缩洗涤剂、终止液、样品稀释液和阴阳性对照品。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

1. 一种用于定性检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于它包含以下组分: (1) 包被了酿酒酵母细胞壁甘露聚糖抗原的酶标板; (2) 酶标抗体溶液; (3) 底物显色液; (4) 浓缩洗涤液; (5) 终止液; (6) 样品稀释液; (7) 阳性对照品; (6) 阴性对照品。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于所述酶标抗体为羊抗人抗体, 其标记酶为辣根过氧化物酶, 酶标抗体溶液为用辣根过氧化物酶稳定剂按 1 : 10000 比例稀释酶标抗体原液而成。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于所述浓缩洗涤液为 pH 值 7.4, 0.01mol/L 的含有 0.8%~1.2% 吐温 20、0.1% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液, 所述百分含量为质量百分含量; 终止液为 2mol/L 的硫酸; 样品稀释液为 pH 值 7.4, 0.01mol/L 的含有 1% 牛血清白蛋白、0.1% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液, 所述百分含量为质量百分含量。

4. 一种定性检测样品中人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的方法, 包括步骤: (1) 样品前处理; (2) 用权利要求 1~3 之任一所述的试剂盒进行检测; (3) 分析检测结果。

5. 如权利要求 4 所述的方法, 其中试剂盒检测为向包被有酿酒酵母细胞壁甘露聚糖抗原的酶标板微孔中加入样品溶液, 温育后洗涤拍干, 再加入酶标抗体, 温育后洗涤拍干, 显色、终止, 用酶标仪测定吸光度值。

## 一种检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒

[0001] 专利申请号：

### 技术领域

[0002] 本发明涉及免疫学检测领域，具体地说，涉及一种定性检测人血清中抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0003] 克罗恩病（又称局限回肠炎、局限性肠炎、节段性肠炎和肉芽肿性肠炎）是一种自身免疫性肠粘膜疾病，它在慢性炎症性肠病中有很高的复发率。克罗恩病病变呈节段性分布，可累及口腔到肛门的各段消化道，多位于结肠和回肠，是一种全壁性炎症。克罗恩病的主要临床表现包括疲劳、右下腹不明原因的疼痛、腹泻（大多数伴有贫血），同时可能伴有不明原因的发热、恶心和呕吐。克罗恩病的发病过程呈现渐进式的特点。大约一半的克罗恩病患者中会出现肠外继发的表现。这些肠外症状主要包括关节痛、关节炎、皮肤病、眼部发炎等，并且这些症状多数会随着慢性炎症性肠病的治疗而消失。此外，克罗恩病的并发症还包括机械性肠梗阻（约 20 ~ 30% 的患者会有此症状），皮肤、肠、膀胱、阴道、肛门、直肠瘘，内部及腹膜后脓肿，肠出血，中毒性巨结肠，小肠癌，骨质疏松和胆结石等多种症状。在欧美国家人群中，克罗恩病的发病率为每 10 万人中有 150 个人。每年新增的病例大约为每 10 万人中有 7-8 人，且在过去 20 年中呈现出持续的增长。克罗恩病在不同性别的人群中的发病率相当。其发病年龄主要集中在 16-35 岁和 60 岁以上的成年人，且在同一家庭的不同成员中的发病率呈上升趋势，显现了一定的遗传相关性。目前，对于克罗恩病的治疗主要包括了药物治疗（如糖皮质激素类，TNF 阻断剂），手术干预（如切除受累肠部位），饮食及心理治疗等方法。

[0004] 抗酿酒酵母抗体是克罗恩病的一个血清学诊断的指标。1988 年，Main 等在慢性炎症性肠病患者的血清中检测到抗酿酒酵母抗体，他们认为更多的抗体与酿酒酵母的结合和克罗恩病中多种感染因素提示了次级免疫反应的失效，这种反应是胰腺分泌物介导的一种免疫系统的特异性反应。抗酿酒酵母抗体可通过酶联免疫法检测。抗酿酒酵母抗体与克罗恩病的疾病表型和严重性密切相关。在克罗恩病患者中，抗酿酒酵母抗体 IgA 和 IgG 类抗体阳性率为 73%。因此，可以通过检测抗酿酒酵母抗体来实现对克罗恩病的诊断。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供一种设计简单，可简化操作、提高分析灵敏度、成本低廉的人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的定性酶联免疫检测方法。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种定性检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒。

[0007] 本发明试剂盒的检测原理如下：

[0008] 用酿酒酵母细胞壁甘露聚糖包被微孔板，制成固相载体，往包被抗原的微孔中分

别加入样本, 孵育后洗涤, 加入辣根过氧化物酶标记的酶标抗体, 室温孵育, 经过彻底洗涤后用底物四甲基联苯胺 (TMB) 显色。四甲基联苯胺 (TMB) 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在终止液的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人抗酿酒酵母 IgA 类抗体呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度, 与临界值相比较, 从而判定样本中人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的存在与否。

[0009] 本发明的技术方案: 本检测试剂盒由 1. 酶标抗体溶液试剂瓶、2. 底物显色液试剂瓶、3. 终止液试剂瓶、4. 浓缩洗涤液试剂瓶、5. 样品稀释液试剂瓶、6. 阳性对照品试剂管、7. 阴性对照品试剂管、8. 酶标板、9. 盒体所组成。试剂瓶 1-7 和酶标板均放置在盒体内。

[0010] 酶标板是包被酿酒酵母细胞壁甘露聚糖抗原的 96 孔聚苯乙烯微量反应板。

[0011] 本发明试剂盒中所涉及试剂的配制方法为:

[0012] a. 酶标抗体溶液的配制: 辣根过氧化物酶-羊抗人 IgA 抗体原液购自美国 Life technologies 公司 (货号: A18787), 用辣根过氧化物酶稳定剂 (购自美国 Thermo scientific 公司, 货号: 37552) 按 1 : 10000 的比例配制工作浓度灌装入试剂瓶中;

[0013] b. 底物显色液的配制: 单组份四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色液购自湖州英创生物科技有限公司 (货号: TMB-S-004), 灌装入试剂瓶中。

[0014] c. 终止液的配制: 2mol/L  $H_2SO_4$  溶液, 灌装入试剂瓶中。

[0015] d. 浓缩洗涤液的配制 (20×PBST): 2.7M NaCl, 94mM KCl, 0.2M  $Na_2HPO_4$ , 40mM  $NaH_2PO_4$ , 1% Tween-20, 调 pH 值为 7.4。灌装入试剂瓶中。

[0016] e. 样品稀释液的配制: 含 1% BSA、0.01% 硫柳汞、pH7.4 的 PBS 溶液 (135mM NaCl, 4.7mM KCl, 10mM  $Na_2HPO_4$ , 2mM  $NaH_2PO_4$ ), 灌装入试剂瓶中。

[0017] f. 阳性对照品的配制: 用辣根过氧化物酶稳定剂按 1 : 200 稀释阳性血清, 灌装入试剂管中;

[0018] g. 阴性对照品的配制: 用辣根过氧化物酶稳定剂按 1 : 200 稀释阴性血清, 灌装入试剂管中;

[0019] 酿酒酵母细胞壁甘露聚糖包被的酶标板制备方法: 酿酒酵母细胞壁甘露聚糖购自德国 Sigma 公司 (货号: M7504), 聚苯乙烯微量反应酶标板购自美国 Corning 公司 (货号: 42592)。将酿酒酵母细胞壁甘露聚糖溶解于含 0.01% 硫柳汞的碳酸盐缓冲液 (15mM  $Na_2CO_3$ , 34.9mM  $NaHCO_3$ , 调 pH 9.6) 中, 终浓度为 10ug/mL。取配制包被抗原溶液 100  $\mu$ L, 加入反应板孔中, 4℃ 冰箱中放置 12-16h, 倒出孔内液体, 用洗涤液 (含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液, pH7.4) 洗涤 3 次, 将酶标板倒置在吸水纸上拍打, 吸干, 在已包被抗原的酶标板小孔中加 100  $\mu$ L 的封闭液 (含 1% BSA、0.01% 硫柳汞、0.05% Tween-20 的 PBS 溶液, pH7.4), 37℃ 恒温培育 1h, 用洗涤液洗涤 3 次, 将酶标板倒置在吸水纸上拍打, 吸干, 在室温下放置 1h 自然晾干后封装。

[0020] 本发明的定性检测人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒的检测方法是将样品溶液加入酶标板小孔中, 同时设置空白、阴性和阳性对照孔, 室温培育 30min, 倒出孔内液体, 重复用洗涤液洗涤 3 次, 将酶标板倒置在吸水纸上拍打; 加入酶标抗体溶液于酶标板小孔中, 室温培育 30min, 用洗涤液重复洗 3 次, 吸干; 加入显色溶液到待测酶标板小孔中, 室温恒温培育 15min, 再加入终止液, 立即显黄色; 用酶标仪在波长 450nm 处测定吸收值。将样品孔的吸收值减去空白孔的吸收值后, 再与参考值进行比较, 从而判断样品中是否检测

出人抗酿酒酵母 IgA 类抗体。

[0021] 本发明所制备的酶联免疫快速检测试剂盒,具有简便、快速、准确的特点,适用于血清样品中人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的检测。

## 附图说明

[0022] 图 1 为试剂盒检测原理示意图。

[0023] 图 2 为人抗酿酒酵母 IgA 类抗体的酶联免疫试剂盒示意图。

## 具体实施方式

[0024] 实施例 1 试剂盒中各组分的制备

[0025] 1. 包被抗原的聚苯乙烯微量反应板:取 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的包被抗原溶液 100  $\mu\text{L}$ ,加入到酶标板小孔中,摇匀,置 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中放置 12-16h。倒出孔内液体,用洗涤液洗涤,重复 3 次,将酶标板倒置在吸水纸上拍打,吸干。在已包被抗原的酶标板小孔中加 100  $\mu\text{L}$  封闭液,室温培育 1h,用洗涤液洗涤 3 次,将酶标板倒置在吸水纸上拍打,吸干,在室温下放置 1h 自然晾干后封装。

[0026] 2. 酶标抗体溶液的配制:用辣根过氧化物酶稳定剂按 1 : 10000 的比例配制成工作浓度后,灌装入试剂瓶中;

[0027] 3. 底物显色液的配制:将购买的单组份四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色液直接灌装入试剂瓶中。

[0028] 4. 终止液的配制:将 98% 的浓硫酸 (18.4 $\text{mol}/\text{L}$ ) 加入到超纯水中配制成 2 $\text{mol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液,灌装入试剂瓶中。

[0029] 5. 浓缩洗涤液的配制 (20 $\times$ PBST):按 2.7M NaCl、94mM KCl、0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、40mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、1% Tween-20、pH 值 7.4 的配方配制浓缩洗涤液,灌装入试剂瓶中。

[0030] 6. 样品稀释液的配制:配制含 1% BSA、0.01% 硫柳汞、pH7.4 的 PBS 溶液 (135mM NaCl, 4.7mM KCl, 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 灌装入试剂瓶中。

[0031] 7. 阳性对照品的配制:用辣根过氧化物酶稳定剂按 1 : 200 的比例稀释阳性血清,灌装入试剂管中;

[0032] 8. 阴性对照品的配制:用辣根过氧化物酶稳定剂按 1 : 200 的比例稀释阴性血清,灌装入试剂管中。

[0033] 将上述的试剂瓶、试剂管及酶标板装入外包装盒内,组成人抗酿酒酵母 IgA 类抗体酶联免疫检测试剂盒。

[0034] 实施例 2 试剂盒的检测方法

[0035] 实验开始前,各试剂均应提前平衡至室温(试剂不能直接在 37 $^{\circ}\text{C}$  溶解);试剂或样品稀释时,均需混匀,混匀时尽量避免起泡。实验前应对样品进行稀释,血清按 1 : 200 比例稀释,以使稀释后的样品符合试剂盒的检测要求。

[0036] 1. 编号:将样品对应微孔按序编号,每板应设阴性对照 2 孔、阳性对照 2 孔、空白对照 2 孔(空白对照孔不加样品及酶标抗体溶液,其余各步操作相同)。

[0037] 2. 加样:分别在阴、阳性对照孔中加入阴性对照、阳性对照各 100  $\mu\text{L}$ 。然后在待测样品孔中加入用样品稀释液稀释后的待测样品 100  $\mu\text{L}$ 。加样时,将样品加于酶标板孔底部,

尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。

[0038] 3. 温育 :室温温育 30 分钟。

[0039] 4. 配液 :将 20 倍浓缩洗涤液加蒸馏水稀释至 400mI 后备用。

[0040] 5. 洗涤 :弃去酶标板内液体,倒扣吸水纸上,轻拍几次吸干液体。每孔加洗涤液 200  $\mu$  I,洗板 3 次,每次浸泡 1-2 分钟,倒扣吸水纸上,轻拍几次吸干溶液。

[0041] 6. 加酶 :每孔加酶标抗体溶液 100  $\mu$  I,空白孔除外。

[0042] 7. 温育 :操作同 3。

[0043] 8. 洗涤 :操作同 5。

[0044] 9. 显色 :每孔加入四甲基联苯胺 (TMB) 显色液 100  $\mu$  I,轻轻震荡混匀,室温避光显色 15 分钟。

[0045] 10. 终止 :每孔加入终止液 100  $\mu$  I,终止反应 (此时蓝色立转黄色)。终止液的加入顺序应尽量与四甲基联苯胺 (TMB) 显色液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性,底物反应时间到后应尽快加入终止液。

[0046] 11. 测定 :选择 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

[0047] 本发明试剂盒提供的检测结果分析过程为 :

[0048] 1. 试验有效性 :

[0049] (1) 试剂空白标准 :空白对照孔平均吸光度值  $< 0.1$  ;

[0050] (2) 阳性对照品标准 : ( 阳性对照孔平均吸光度值 - 空白对照孔平均吸光度值 )  $\geq 1.00$  ;

[0051] (3) 阴性对照品标准 : ( 阴性对照孔平均吸光度值 - 空白对照孔平均吸光度值 )  $\leq 0.3$ 。

[0052] 2. 临界值计算 :临界值 = ( 阴性对照孔平均吸光度值 - 空白对照孔平均吸光度值 ) + 0.33。

[0053] 3. 检测结果的解释 :

[0054] (1) 当 ( 样品平均吸光度值 - 空白对照孔平均吸光度值 )  $\leq$  临界值,结果为阴性,血清样本中未检测出人抗酿酒酵母 IgA 类抗体 ;

[0055] (2) 当 ( 样品平均吸光度值 - 空白对照孔平均吸光度值 )  $>$  临界值,结果为阳性,血清样本中检测出人抗酿酒酵母 IgA 类抗体。

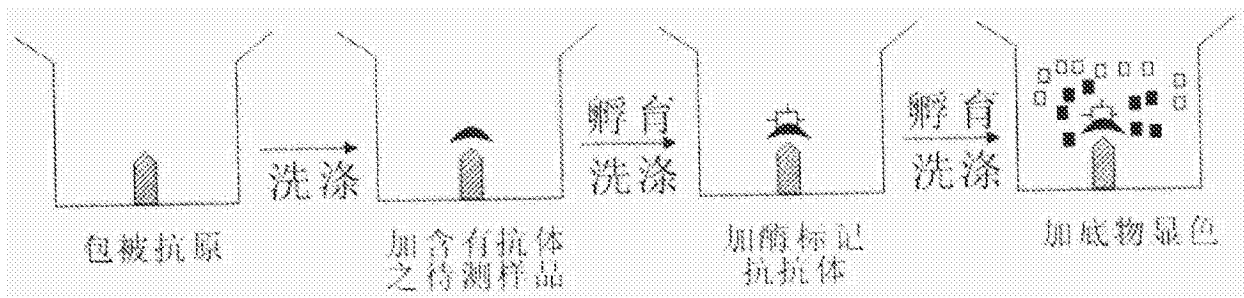


图 1

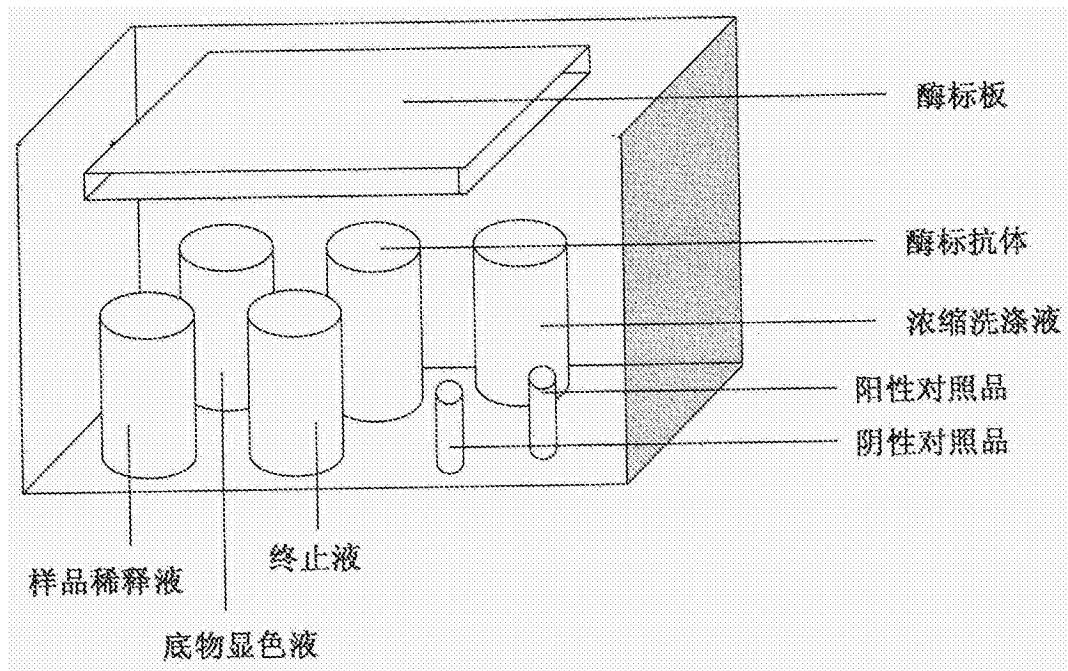


图 2

|                |                                                                  |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种检测人抗酿酒酵母IgA类抗体的酶联免疫试剂盒                                         |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN105987996A</a>                                     | 公开(公告)日 | 2016-10-05 |
| 申请号            | CN201510066294.2                                                 | 申请日     | 2015-02-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东莞博捷生物科技有限公司<br>东莞中山大学研究院<br>广东中大南海海洋生物技术工程中心有限公司                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 东莞博捷生物科技有限公司<br>东莞中山大学研究院<br>广东中大南海海洋生物技术工程中心有限公司                |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 东莞博捷生物科技有限公司<br>东莞中山大学研究院<br>广东中大南海海洋生物技术工程中心有限公司                |         |            |
| [标]发明人         | 徐安龙<br>张广献<br>梁东<br>荆琛峰<br>周靖宇<br>吴赞<br>张鸿运<br>覃伟恒<br>吴松青<br>严万两 |         |            |
| 发明人            | 徐安龙<br>张广献<br>梁东<br>荆琛峰<br>周靖宇<br>吴赞<br>张鸿运<br>覃伟恒<br>吴松青<br>严万两 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/558 G01N33/535                                            |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                   |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供一种定性检测人抗酿酒酵母IgA类抗体的酶联免疫试剂盒。该酶联免疫试剂盒包括：包被酿酒酵母细胞壁甘露聚糖抗原的酶标板、酶标抗体、底物显色液、浓缩洗涤剂、终止液、样品稀释液和阴阳性对照品。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测人抗酿酒酵母IgA类抗体的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测人抗酿酒酵母IgA类抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

