



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103105489 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201310024747. 6

(22) 申请日 2013. 01. 23

(71) 申请人 深圳市亚辉龙生物科技有限公司  
地址 518054 广东省深圳市南山区兴海路荔  
山工业区 5 栋 1-4 层

(72) 发明人 胡鹏辉 阳辉 刘清波 何林

(74) 专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公  
司 44218

代理人 黄良宝

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

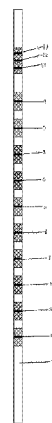
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

## (54) 发明名称

检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒  
及其制备方法

## (57) 摘要

检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法, 涉及一种检测多种自身免疫性疾病相关抗体的免疫印迹试剂盒, 解决目前尚无用于多种自身免疫性疾病体检筛查的免疫印迹产品的技术不足; 在所述的硝酸纤维素膜或尼龙膜上含有: 分别由 dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG、AMA-M2 共 10 种中的至少两种天然或重组抗原包被而成的两条以上平行的检测线, 1 条高浓度质控带, 1 条中浓度质控带, 及 1 条低浓度质控带。克服单一自身抗体检测灵敏度和特异性不足、数种疾病相关自身抗体逐一单独检测在操作上的繁琐, 大大提高检测效率和结果判断的准确度。



1. 检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒,包括:反应膜条、酶结合物、显色底物、洗涤液、样本稀释液和终止液,其特征在于:所述的反应膜条由载体和固定在载体上的硝酸纤维素膜或尼龙膜所组成,在所述的硝酸纤维素膜或尼龙膜上含有:分别由 dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG、AMA-M2 共 10 种中的至少两种天然或重组抗原包被而成的两条以上平行的检测线,1 条包被浓度为 30-50  $\mu\text{g/ml}$  的高浓度质控带,1 条包被浓度为 15-25  $\mu\text{g/ml}$  的中浓度质控带,及 1 条包被浓度为 1-10  $\mu\text{g/ml}$  的低浓度质控带。

2. 根据专利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的载体为双面粘性的 PVC 板,正面与所述的硝酸纤维膜或尼龙膜固定粘接,背面固定粘接有透明的 PET 底衬板。

3. 根据专利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的高浓度质控带、中等浓度质控带和低浓度质控带由人 IgG,或抗鼠 IgG 或抗羊 IgG 划线而成。

4. 根据专利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗人 IgG;所述的显色底物为四甲基联苯胺;所述的洗涤液为 20 $\times$ Tris 缓冲液;所述样本稀释液为含封闭剂的 Tris 缓冲液;所述的终止液为 0.1M/L 硫酸。

5. 权利要求 1~4 任一项所述试剂盒的制备方法,包括有反应膜条制备方法,其特征在于所述反应膜条制备方法包括有以下步骤:

1) 配制点样溶液:将 dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG 和 AMA-M2 抗原,及人 IgG、抗鼠 IgG 或抗羊 IgG 质控配制成相应的包被浓度;

2) 固定抗原:根据免疫印迹点样器的大小,将硝酸纤维素膜或尼龙膜裁成膜片,通过物理吸附和共价结合的方式,将 1) 中配置好的点样溶液以一定的排列次序固定在膜片上,形成独立的检测线;

3) 封闭:将膜片放在无关蛋白或血清的溶液中对其非点样部位进行封闭,所述的无关蛋白或血清包括脱脂奶粉、酪蛋白、牛血清白蛋白、饱和赖氨酸和小牛血清;

4) 干燥:将封闭好的膜片条放入 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中干燥 2 小时;

5) 贴膜:将干燥好的膜片贴于双面粘性的 PVC 板的正面,PVC 板的背面待用;

6) 切膜:将 5) 中贴好的膜片按照独立检测线切成一定宽度的条带;

7) 组装:通过模具,将 6) 中的条带按次序贴于透明的 PET 底衬板上;

8) 切条:用切条机将组装好的条带切成单人份反应膜条。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:所述的封闭用无关蛋白选用 5% 的脱脂奶粉,在室温下封闭 0.5 小时。

7. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:在 2) 步完成点样后,将膜片从免疫印迹点样器取出室温下放置 1 小时。

8. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:固定抗原和质控的点样量控制在 10ng~30ng。

9. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:质控带的宽度均为 7mm,抗原条带的宽度均为 5mm。

## 检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测多种自身免疫性疾病相关抗体的免疫印迹试剂盒,还涉及该免疫印迹试剂盒的制备方法及使用的方法,属于生物医学领域。

### 背景技术

[0002] 自身免疫性疾病(autoimmune diseases)是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病,WHO(World Health Organization,世界卫生组织)曾指出其患病人数在占总人群的3~5%,据权威统计,我国自身免疫性疾病患者的发病率在6000万人以上。自身免疫性疾病好发于女性和中老年人,其特点是起病缓慢,病程长且反复发作,疾病的中晚期对健康危害很大,患者的生活质量低,疗效差,早期诊断有助于自身免疫性疾病的临床控制。

[0003] 许多自身抗体在相关疾病的发病前一段时间就可从血清中检测到。几十年来,免疫学研究已经发现多数自身免疫性疾病患者血清中存在着特异性自身抗体,例如系统性红斑狼疮的抗Sm抗体和抗dsDNA抗体,类风湿关节炎的抗CCP抗体,干燥综合症的抗SSA抗体和抗SSB抗体,I型糖尿病的抗GAD抗体、抗ICA抗体和抗IA-2A抗体,自身免疫性甲状腺疾病的抗TG抗体、原发性胆汁性肝硬化的抗AMA-M2抗体,许多特异性自身抗体是自身免疫性疾病诊断标准中重要的组成部分。

[0004] 系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合征、I型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、原发性胆汁性肝硬化等是常见的自身免疫疾病,其临床表现的特点往往被患者忽视,因此,需要定期进行体检筛查。目前,国内外临床检验领域已有少数用于单一自身免疫性疾病相关抗体检测的免疫印迹产品,但尚无用于多种自身免疫性疾病体检筛查的免疫印迹产品。已有免疫印迹试剂基本采用SDS-PAGE技术将抗原按分子量大小转移到印迹膜上,在此过程中许多抗原决定簇的构象可能遭到破坏,不能与临床样本中的特异性抗体发生结合或发生非特异性结合,造成结果判断错误。并且,现有产品质控体系不完善,不便于操作者对显色结果进行快速、直观、准确的判断。

### 发明内容

[0005] 综上所述,本发明的目的在于针对目前尚无用于多种自身免疫性疾病体检筛查的免疫印迹产品,以及已有的免疫印迹试剂存在上述不足,而提出的一种检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法。

[0006] 为实现本发明的目的,采用如下的技术方案:

检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒,包括:反应膜条、酶结合物、显色底物、洗涤液、样本稀释液和终止液,其特征在于:所述的反应膜条由载体和固定在载体上的硝酸纤维素膜或尼龙膜所组成,在所述的硝酸纤维素膜或尼龙膜上含有:分别由dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG、AMA-M2共10种中的至少两种天然或重组抗原包被而成的两条以上平行的检测线,1条包被浓度为30-50 μg/ml的高浓度质控带,1条包被浓度为

15-25  $\mu\text{g/ml}$  的中浓度质控带,及 1 条包被浓度为 1-10  $\mu\text{g/ml}$  的低浓度质控带。

[0007] 所述的载体为双面粘性的 PVC 板,正面与所述的硝酸纤维膜或尼龙膜固定粘接,背面固定粘接有透明的 PET 底衬板。

[0008] 所述的高浓度质控带、中等浓度质控带和低浓度质控带由人 IgG,或抗鼠 IgG 或抗羊 IgG 划线而成。

[0009] 所述的酶结合物为辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG;所述的显色底物为四甲基联苯胺;所述的洗涤液为 20 $\times$ Tris 缓冲液;所述样本稀释液为含封闭剂的 Tris 缓冲液;所述的终止液为 0.1M/L 硫酸。

[0010] 制备所述试剂盒的方法,包括有反应膜条制备方法,其特征在于所述反应膜条制备方法包括有以下步骤:

1) 配制点样溶液:将 dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG 和 AMA-M2 抗原,及人 IgG、抗鼠 IgG 或抗羊 IgG 配制成相应的包被浓度;

2) 固定抗原:根据免疫印迹点样器的大小,将硝酸纤维膜或尼龙膜裁成膜片,通过物理吸附和共价结合的方式,将 1) 中配置好的点样溶液以一定的排列次序固定在膜片上,形成独立的检测线;

3) 封闭:将膜片放在无关蛋白或血清的溶液中对其非点样部位进行封闭,所述的无关蛋白或血清包括脱脂奶粉、酪蛋白、牛血清白蛋白、饱和赖氨酸和小牛血清;

4) 干燥:将封闭好的膜片条放入 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中干燥 2 小时;

5) 贴膜:将干燥好的膜片贴于双面粘性的 PVC 板的正面,PVC 板的背面待用;

6) 切膜:将 5) 中贴好的膜片按照独立检测线切成一定宽度的条带;

7) 组装:通过模具,将 6) 中的条带按次序贴于透明的 PET 底衬板上;

8) 切条:用切条机将组装好的条带切成单人份反应膜条。

[0011] 在 2) 步完成点样后,将膜片从免疫印迹点样器取出室温下放置 1 小时。

[0012] 固定抗原和质控的点样量控制在 10ng~30ng。

[0013] 质控带的宽度均为 7mm,抗原条带的宽度均为 5mm。

[0014] 相对于现有技术,本发明具有如下优点:

本发明通过一份临床样本和一次检测反应检测多种自身抗体,克服单一自身抗体检测灵敏度和特异性不足、数种疾病相关自身抗体逐一单独检测在操作上的繁琐,大大提高检测效率和结果判断的准确度。涉及的自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征、I 型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、原发性胆汁性肝硬化。另外还有:

1、反应膜条上包被的抗原为从动物组织中提取的天然抗原或采用昆虫细胞或杆状病毒真核表达的方式获得的重组蛋白,提高了自身免疫疾病诊断的敏感性和特异性;

2、抗原包被采用全自动点样仪,保证膜条上质控带及各抗原带位置的准确性,且可根据检测需求进行合理排序,区别于传统的 SDS-PAGE 技术按分子量大小将抗原依次分开转移至印迹膜上,同时保证了抗原决定簇构象的完整性;

3、单人份膜条上同时包被有 10 种抗原,可实现一份临床样本一次实验最多可同时检测 10 种抗体,为多种自身免疫性疾病的临床诊断提供血清学依据;

4、具有高浓度质控带、中浓度质控带和低浓度质控带,使结果判断更为直观准确,为自身免疫性疾病的病程监测及治疗预后提供全面指导。

## 附图说明

[0015] 图 1 为本发明所述试剂盒中反应膜条上抗原及质控带分布示意图；

图 2 为本发明所述试剂盒中反应膜条上抗原及质控带截面示意图。

## 具体实施方式

[0016] 本发明公开了一种检测多种自身免疫性疾病相关抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,通过适当改进工艺参数而实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明所要求保护的技术方案之内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0017] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0018] 本发明的检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒包括:反应膜条、酶结合物、显色底物、洗涤液、样本稀释液和终止液;所述的反应膜条由载体和固定在载体上的硝酸纤维素膜或尼龙膜所组成,在所述的硝酸纤维素膜或尼龙膜上含有:分别由 dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG、AMA-M2 共 10 种天然或重组抗原包被而成的 10 条平行的检测线 1~10,1 条包被浓度为 30-50  $\mu\text{g/ml}$  的高浓度质控带 11,1 条包被浓度为 15-25  $\mu\text{g/ml}$  的中浓度质控带 12,及 1 条包被浓度为 1-10  $\mu\text{g/ml}$  的低浓度质控带 13。实现单人份膜条上同时包被有 10 种抗原,可实现一份临床样本和一次检测反应检测多种自身抗体,最多可同时检测 10 种抗体,为多种自身免疫性疾病的临床诊断提供血清学依据,如:自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征、I 型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、原发性胆汁性肝硬化。

[0019] 参照图 1 和图 2 中所示,所述反应膜条的载体为双面粘性的 PVC 板 15,正面与形成检测线和质控带之后的所述硝酸纤维素膜或尼龙膜 16 固定粘接,背面固定粘接有透明的 PET 底衬板 14。所述的高浓度质控带、中等浓度质控带和低浓度质控带由人 IgG,或抗鼠 IgG 或抗羊 IgG 划线而成。所述的酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗人 IgG;所述的显色底物为四甲基联苯胺;所述的洗涤液为 20 $\times$  Tris 缓冲液;所述样本稀释液为含封闭剂的 Tris 缓冲液;所述的终止液为 0.1M/L 硫酸。

[0020] 本发明的检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒的制备方法,包括有反应膜条制备方法,其特征在于所述反应膜条制备方法包括有以下步骤:

1) 配制点样溶液:将 dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG 和 AMA-M2 抗原,及人 IgG、抗鼠 IgG 或抗羊 IgG 质控配制成相应的包被浓度;

2) 固定抗原:根据免疫印迹点样器的大小,将硝酸纤维素膜或尼龙膜裁成膜片,通过物理吸附和共价结合的方式,将 1) 中配置好的点样溶液以一定的排列次序固定在膜片上,形成独立的检测线;固定抗原和质控的点样量控制在 10ng~30ng;质控带的宽度均为 7mm,抗原条带的宽度均为 5mm;完成点样后,将膜片从免疫印迹点样器取出室温下放置 1 小时。

[0021] 3) 封闭:将膜片放在无关蛋白或血清的溶液中对非点样部位进行封闭,所述的

无关蛋白或血清包括脱脂奶粉、酪蛋白、牛血清白蛋白、饱和赖氨酸和小牛血清；优选 5% 的脱脂奶粉，在室温下封闭 0.5 小时。用经 20 倍稀释的浓缩洗涤液洗涤。

[0022] 4) 干燥：将封闭好的膜片条放入 37℃ 恒温箱中干燥 2 小时；

5) 贴膜：将干燥好的膜片贴于双面粘性的 PVC 板的正面，PVC 板的背面待用；

6) 切膜：将 5) 中贴好的膜片按照独立检测线切成一定宽度的条带；其中，3 条质控带的宽度均为 7mm，10 种抗原条带的宽度均为 5mm。

[0023] 7) 组装：通过模具，将 6) 中的条带按次序贴于透明的 PET 底衬板上；

8) 切条：用切条机将组装好的条带切成单人份反应膜条，优选宽度为 2mm。

[0024] 本发明试剂盒的使用方法

样品要求：人血清或 EDTA、肝素或柠檬酸盐抗凝的血浆。

[0025] 1、洗涤液配制：用 19 份蒸馏水稀释 1 份 20× 的浓缩洗涤液，混匀，备用。

[0026] 2、检测步骤

1) 将反应膜条放入孵育盘(通用实验耗材)中，加入 1ml 的样本稀释液润湿膜条，1 分钟后移弃稀释液；

2) 加入 1ml 已稀释的样本，置摇床轻摇，室温孵育 30 分钟，然后弃除已稀释的样本，不留残液；

3) 用 1.5ml 洗涤液洗涤反应膜条，置摇床轻摇，每次 5 分钟，洗涤完后弃除洗涤液，重复 3 次；

4) 加入 1ml 酶结合物溶液，置摇床轻摇，室温孵育 30 分钟，弃除酶结合物溶液；

5) 重复步骤 3)；

6) 加入 1ml 显色底物溶液，置摇床轻摇，室温避光孵育 10 分钟，弃除底物溶液；

7) 用 1.5ml 蒸馏水洗涤，置摇床轻摇，1 分钟后弃除蒸馏水；

8) 加入 1ml 终止液，置摇床轻摇，室温孵育 5 分钟，弃除终止液；

9) 取出反应膜条，用吸水纸吸干其上的残留液体；

3、结果判断

反应完成后，可采用目测、手工粘贴到扫描仪扫描固定卡然后借助特定的判读软件或使用全自动的判读分析仪器对检测结果进行判读，结果可判断为阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性或输出为量化的数值。

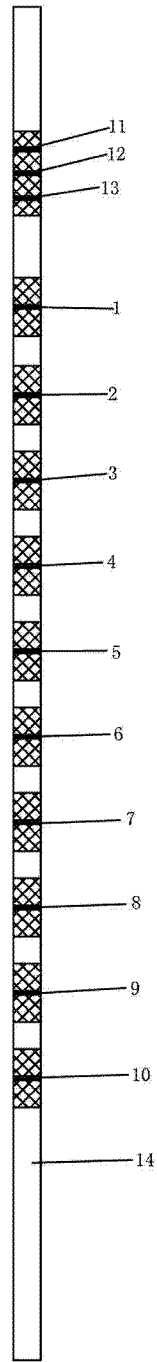


图 1

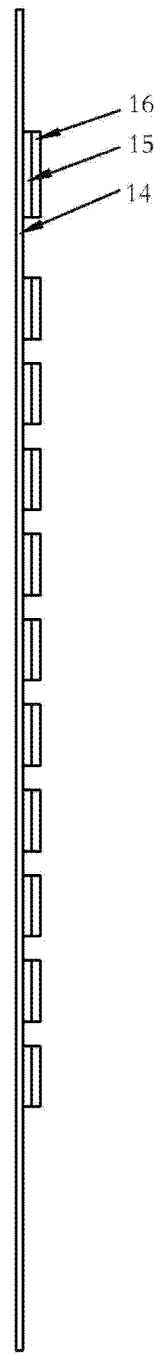


图 2

专利名称(译)	检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103105489A</a>	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	CN201310024747.6	申请日	2013-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
[标]发明人	胡鸱辉 阳辉 刘清波 何林		
发明人	胡鸱辉 阳辉 刘清波 何林		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531		
代理人(译)	黄良宝		
其他公开文献	CN103105489B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

检测自身免疫性疾病抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法，涉及一种检测多种自身免疫性疾病相关抗体的免疫印迹试剂盒，解决目前尚无用于多种自身免疫性疾病体检筛查的免疫印迹产品的技术不足；在所述的硝酸纤维素膜或尼龙膜上含有：分别由dsDNA、Sm/RNP、CCP、SSA、SSB、GAD、ICA、IA-2A、TG、AMA-M2共10种中的至少两种天然或重组抗原包被而成的两条以上平行的检测线，1条高浓度质控带，1条中浓度质控带，及1条低浓度质控带。克服单一自身抗体检测灵敏度和特异性不足、数种疾病相关自身抗体逐一单独检测在操作上的繁琐，大大提高检测效率和结果判断的准确度。

