

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710027823.3

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 101294957A

[22] 申请日 2007.4.29

[21] 申请号 200710027823.3

[71] 申请人 郭志程

地址 510080 广东省广州市番禺区祈福新邨
倚云居 6 座 2002 室

[72] 发明人 郭志程

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司
代理人 曾旻辉

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

HLA - B27 磁性酶联免疫试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种 HLA - B27 磁性酶联免疫试剂盒，它主要包括酶稀释液，酶结合物，包被有与 HLA - B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠的微孔板板条。该试剂盒制备方法主要包括 (A) 共价耦联免疫磁性微珠和 HLA - B27 抗体；(B) 酶结合物的制备；(C) 包被微孔板。该 HLA - B27 磁性酶联免疫试剂盒具有快速、简单、准确、成本低等优点。

1.一种 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，主要包括酶稀释液，酶结合物，其特征是，还包括有：包被有与 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠的微孔板板条。

2.根据权利要求 1 所述的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，其特征是，还包括有 HRP 耦联 HLA-B27 抗体分子的阳性对照。

3.根据权利要求 1 所述的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，其特征是，酶稀释液为加有 1%BSA、0.1% Proclin300 的 0.01M PBS。

4.根据权利要求 1-3 任一所述的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，其特征是，所述酶结合物为与抗 CD45 抗体耦联的 HRP。

5.根据权利要求 4 所述的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，其特征是，HLA-B27 抗体与抗 CD45 酶结合物的稀释度为 1：50。

6.根据权利要求 1-3 任一所述的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，其特征是，该试剂盒用于检测的全血标本是以 EDTA-K3 作为抗凝剂。

7.一种制备权利要求 1 所述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的方法，其特征是，主要包括以下步骤：

(A)共价耦联免疫磁性微珠和 HLA-B27 抗体：PBS，pH6.5-7.5 洗涤 1ml 免疫磁性微珠 1-5 次，加入抗体 8-12mg/ml，共 1ml，混匀后，加入双功能耦联剂 BS³，使其终浓度为 0.8-1.2mM，室温孵育 20-40min，加入终止液 0.7-1.2M Tris 缓冲液，pH6.5-7.5，室温孵育 7-13min，用 PBS 洗涤 2-5 次，恢复体积 1ml；

(B)酶结合物的制备；

(C)包被微孔板：

将与步骤(A)制备的 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠 2-4 ul/孔加入到微孔板中。

8.根据权利要求 7 所述的上述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法，其特征是：所述酶结合物的制备为：称取 10mgHRP 置于干净容器中，加入 0.2mol/L pH 为 5.6 的醋酸盐缓冲液，待酶溶解后，加入 0.06mol/LNaIO₄ 溶液，室温反应 10-30 分钟；加入 0.16mol/L 乙二醇-10%氯化钠溶液，于室温下反应 10-30 分钟后装入透析袋中，用 0.001mol/LpH 为 4.0 的醋

酸盐缓冲液透析过夜；加入 2mol/L pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液，加入待标记的抗 CD45 抗体 9-11mg 后，4℃搅拌反应 2 小时，然后加入新配制的浓度为 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液，4℃搅拌反应 1—3 小时；滴加饱和的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液，4℃搅拌放置 20—40 分钟，离心 10—30 分钟，弃上清，将沉淀溶于 0.02mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液；用 0.02 mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 18—30 小时，取出透析液，加入等体积酶保护液后，再加入等体积甘油，混匀。

9.根据权利要求 7 所述的上述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法，其特征是：步骤(C)加入到微孔板中的 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠为 3ul/孔。

10.根据权利要求 7—9 任一所述的上述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法，其特征是：共价耦联免疫磁性微珠和 HLA-B27 抗体为：PBS，pH7.0 洗涤 1ml 免疫磁性微珠 3 次，加入抗体 10mg/ml，共 1ml，混匀后，加入双功能耦联剂 BS^3 ，使其终浓度为 1mM，室温孵育，30min，加入终止液 1M Tris 缓冲液，pH7.0，室温孵育 10min，用 PBS 洗涤 3 次，恢复体积 1ml，然后加入 1%BSA 作为稳定剂，0.1%NaN₃ 作为防腐剂。

HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明属于医疗器械领域，具体地是涉及一种 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒及其制备方法。

背景技术

强直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种结缔组织疾病，在人群中的患病率为 0.2%-0.4%，发病年龄大多在 30 岁以内，占 65%。平均病程 4-6 年。主要症状是腰、骶及下肢关节疼痛。常伴有晨僵、夜间重、活动后轻等特点。与成年人的 AS 不同，青少年 AS 在发病初期引起骨骼病变的症状出现较少，可能有 24% 的儿童主诉四肢关节痛或只有足跟痛，但末梢关节病变表现已很明显。AS 主要表现为椎间盘纤维环和纤维环附近结缔组织的骨化、椎间关节和四肢关节滑膜的炎症和增生。晚期患者脊柱僵硬呈板状，活动受限。晚期致残率高。因而早期诊断、治疗具有重要意义。

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 是白细胞膜上的一种同种抗原，依不同的位点编码，具有重要的生理功能。早在 1973 年，Brewerton 等报道了 HLA-B27 与强直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis, AS) 强相关。在 AS 患者中，88%—96% 的患者具有 HLA-B27 抗原，而正常对照组中具有 B27 抗原者仅为 4%-8%。相对危险率达 90%。

尽管 HLA-B27 与强直性脊椎炎有很强的相关性，但查出 HLA-B27 阳性并不能确诊为强直性脊椎炎，HLA-B27 是强直性脊椎炎的一个易发病的因素。

HLA-B27 检测不能作为血清学阴性脊柱关节病的确诊指标，但在以下几个方面将有助于诊断：

- 1 如果症状和体征提示脊柱关节病变发生的可能性超过 50%，那么 B27 抗原阳性显著增加正确诊断的机会。
- 2 背痛及强直的患者，B27 抗原阴性强烈提示患有其他疾病。在不伴有牛皮癣及炎症性小肠病变时，B27 抗原阴性可排除 AS 诊断。

3 患有炎症性关节病变的青少年，B27 抗原阳性可提示，可能会发生血清学阴性脊柱关节病变。

4 预测 AS 患者家庭成员发生 AS 的可能性。如果某成员携带有与 AS 相关的单倍型，尤其是男性，则预示其发病的可能性较大，为 20%-30%，不带有该单倍型者，发病的可能性极小，几乎为 0。

早期检测 HLA-B27 抗原的方法是微量淋巴细胞毒试验（microlymphocytotoxicity test, MLCT）。该方法费时费力，现已逐渐被流式（flow cytometry, FC）所取代。但 FC 价格昂贵，操作复杂。最近，又发展了以 PCR 为基础的方法，虽然该方法准确性高，但不适合做大样本快速筛查。

酶标免疫磁性抗体分离检测技术（M a g n e t i c A n t i - b o d y I m m u n o A s s a y M A I A）是一项高灵敏度的酶免技术，其检测灵敏度可达到放射免疫法的水平。它将免疫磁性微珠分离技术引入酶联免疫测定领域。磁性微珠连接的单克隆抗体与相应的标本抗原结合后，在磁力的作用下，特异性结合的抗原与其它物质分离，再通过酶联免疫显色反应，测定其含量。迄今为止，还未有人将该技术应用到 HLA-B27 抗原检测。

发明内容

本发明需要解决的技术问题之一是提供一种 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，该试剂盒建立在磁性免疫分离和酶检测原理上，具有快速、简单、准确性高等优点。

解决上述技术问题的技术内容为：

一种 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒，主要包括酶稀释液，酶结合物，还包括有：

包被有与 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠的微孔板板条。

优选地，所述酶结合物为耦联有抗 CD45 抗体的 HRP，即抗 CD45 酶结合物。

HLA-B27 抗体与抗 CD45 酶结合物的稀释度为 1：50。

该试剂盒还包括有，HRP 耦联 HLA-B27 抗体分子的阳性对照。

酶稀释液优选为加有 1%BSA（小牛血清白蛋白）、0.1% Proclin300 的 0.01M PBS 缓冲

液。

本发明所述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒用于检测 EDTA-K3（乙二胺四乙酸三钾）作为抗凝剂的全血标本。

本发明的另一需要解决的技术问题是提供上述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法。

一种 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法，主要包括以下步骤：

(A)共价耦联免疫磁性微珠和 HLA-B27 抗体：PBS 缓冲液（NaCl 137mmol/L，KCl 2.7mmol/L， Na_2HPO_4 4.3mmol/L， KH_2PO_4 1.4mmol/L），pH6.5-7.5 洗涤 1ml 免疫磁性微珠 1-5 次，加入抗体 8-12mg/ml，共 1ml，混匀后，加入双功能耦联剂 BS^3 (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate)，使其终浓度为 0.8-1.2mM，室温孵育 20-40min，加入终止液 0.7-1.2M Tris 缓冲液，pH 6.5-7.5，室温孵育 7-13min，用 PBS 洗涤 2-5 次，恢复体积 1ml；

(B)酶结合物的制备；

(C)包被微孔板：

将与 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠 2-4 μl /孔加入到微孔板中。

加入到微孔板中的 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠优选为 3 μl /孔。

优选地，共价耦联免疫磁性微珠和 HLA-B27 抗体包括：PBS，pH7.0 洗涤 1ml 免疫磁性微珠 3 次，加入抗体 10mg/ml，共 1ml。混匀后，加入双功能耦联剂 BS^3 ，使其终浓度为 1mM，室温孵育，30min，加入终止液 1M Tris 缓冲液，pH7.0，室温孵育 10min，用 PBS 洗涤 3 次，恢复体积 1ml。然后加入 1%BSA 作为稳定剂，0.1%NaN₃ 作为防腐剂。

酶结合物的制备包括：准确称取 10mgHRP（辣根过氧化物酶）置于干净容器中，加入 0.2mol/L pH 为 5.6 的醋酸盐缓冲液，待酶溶解后，加入 0.06mol/LNaIO₄ 溶液室温反应 20 分钟；加入 0.16mol/L 乙二醇-10%氯化钠溶液，于室温下反应 20 分钟后；将上述酶液装入透析袋中，用 0.001mol/LpH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液透析过夜；加入 2mol/L pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液，加入待标记的抗 CD45 抗体 10mg 后，4℃搅拌反应 2 小时。然后加入新配制的 NaBH₄ 溶液(浓度为 5mg/ml)，4℃搅拌反应 2 小时；滴加饱和的(NH₄)₂SO₄ 溶液，4℃搅拌放置 30 分钟，3500 转/分钟离心 20 分钟，弃上清，将沉淀溶于 0.02mol/LpH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液；

用 0.02 mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 24 小时，取出透析液，加入等体积酶保护液后，再加入等体积甘油，混匀后 -20℃ 保存。

该试剂盒还可以包括酶联免疫试剂盒常用的底物液 A、底物液 B、终止液、20 倍浓缩洗液、阴性对照。

病人全血样本（EDTA-K3 抗凝）与 HRP 标记的抗细胞抗体都加入到含有 HLA-B27 抗体免疫磁性微珠的微孔板微孔中，若样本中的白细胞上有 HLA-B27 抗原，经短时孵育，免疫磁性微珠与白细胞结合，此时 HRP 标记的抗细胞抗体连接到细胞上。洗涤后，免疫磁性微珠、细胞和酶被保留下来；若白细胞上没有 B27 抗原，通过洗涤，细胞和酶均被清洗掉；之后加入酶底物液显色，450nm 读取光密度值。

本发明所述的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒具有稳定、性能好等优点。

用本发明所述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒进行 310 份血样检验。同时做流式 HLA-B27 试剂用于对照。

表 1 与流式对比统计结果

	流式阳性	流式阴性	
阳性	35	8	43
阴性	2	265	267
	37	273	310

以流式方法作为金标准，本发明 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的灵敏度为 $35/37=94.6\%$ ，特异性为 $265/273=97.1\%$ ，准确性为 $(35+265)/310=96.8\%$ ，说明该试剂盒与流式的结果符合很好。

酶结合物稳定性试验：

实验方法

将分装好的酶结合物和稀释液于 37℃ 生化培养箱放置七天，取出平衡室温后与保存在 4℃ 的酶结合物和稀释液同时实验。

实验结果

表 2 抗体-酶结合物 37℃与 4℃存放七天后的对比

	抗 CD45 酶结合物 OD 值			
	37℃		4℃	
HLA-B27	0.744	0.741	0.835	0.861
非 HLA-B27	0.053	0.067	0.070	0.060

由表 2 可知, 抗 CD45 酶结合物置 37℃生化培养箱存放七天后, 除 OD 值稍有所降低外, 对其他指标并无影响, 其稳定性良好, 完全可用于 HLA-B27 磁性酶免疫分析。

本发明所述的制备方法得到的 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法还具有快速、简单、准确、成本低等优点。

具体实施方式

一种 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒, 包括 1%BSA、0.1% Proclin300 的 0.01M PBS 的酶稀释液, 抗 CD45 酶结合物, 包被有与 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠的微孔板板条, HRP 耦联 HLA-B27 抗体分子的阳性对照、使用时配备有酶联免疫试剂盒常用的底物液 A、底物液 B、终止液、20 倍浓缩洗液, 0.2MPBS 的阴性对照, 其中, 使用时, HLA-B27 抗体与 CD45 酶结合物的稀释度为 1: 50。

上述 HLA-B27 磁性酶联免疫试剂盒的制备方法, 主要包括以下步骤:

(A)共价耦联免疫磁性微珠和 HLA-B27 抗体:

PBS, pH7.0 洗涤 1ml 免疫磁性微珠 3 次, 加入抗体 10mg/ml, 共 1ml, 混匀后, 加入双功能耦联剂 BS³ (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate), 使其终浓度为 1mM, 室温孵育 30min, 加入终止液 1M Tris 缓冲液, Ph7, 室温孵育 10min, 用 PBS 洗涤 3 次, 恢复体积 1ml。然后加入 1%BSA (小牛血清白蛋白) 作为稳定剂, 0.1%NaN₃ 作为防腐剂。

(B)酶结合物的制备:

准确称取 10mgHRP (辣根过氧化物酶) 置于一干净容器中, 加入 0.2mol/L pH 为 5.6 的醋酸盐缓冲液 1ml, 待 HRP 溶解后, 加入 0.06mol/LNaIO₄ 溶液 1ml, 室温反应 20 分钟; 加

入 0.16mol/L 乙二醇-10%氯化钠溶液 1ml, 于室温下反应 20 分钟后; 将上述酶液装入透析袋中, 用 0.001mol/L pH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液透析过夜; 加入 2mol/L pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液, 加入待标记的抗 CD45 抗体 10mg 后, 4℃搅拌反应 2 小时。然后加入新配制的 NaBH_4 溶液(浓度为 5mg/ml) 2ml, 4℃搅拌反应 2 小时; 滴加饱和的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液 5ml, 4℃搅拌放置 30 分钟, 3500 转/分钟离心 20 分钟, 弃上清, 将沉淀溶于 0.02mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 5ml; 用 0.02 mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 24 小时, 取出透析液, 加入等体积酶保护液后, 再加入等体积甘油, 混匀后-20℃保存。

(C)包被微孔板

按 3ul/孔将与 HLA-B27 抗体共价耦联免疫磁性微珠加入到微孔板中, 真空封装。

本实施例所用所述底物液 A、底物液 B、终止液、20 倍浓缩洗液购自深圳市安群生物工程有限公司, 也可按以下方法制备:

底物液 A 的制备:

在混合容器中加入生产总量 0.2MPBS 5%;

混合容器中按 5g/1000ml 加入 H_2O_2 . 搅拌至完全均匀.

加纯水至生产总体积, 搅拌均匀; 分装。

底物液 B 的制备:

在混合容器中加入生产总量 0.2MPBS 5%;

混合容器中按 3g/1000ml 加入 TMB. 搅拌至完全均匀。

加纯水至生产总体积, 搅拌均匀; 分装。

20 倍浓缩液的制备:

在混合容器中加入生产总量 0.2MPBS 85%;

混合容器中按 0.5ml/1000ml 加入吐温 20, 搅拌至完全均匀。

加 0.2MPBS 至生产总体积, 搅拌均匀; 分装

终止液的制备:

在混合容器中加入生产总量纯水 60%;

混合容器中按 125ml 加入浓硫酸, 搅拌均匀;

加纯水至生产总体积, 搅拌均匀; 分装。

因为人细胞很难保存, 所以将 HLA-B27 分子耦联上 HRP, 作为本发明试剂盒的阳性对照, 其耦联方法与抗白细胞抗体 (抗 CD45 抗体) 耦联 HRP 相同。

以上所有试剂都应于 4℃ 避光贮藏。

经过多次实验的反复对比测定抗凝剂的影响, 在多种抗凝剂 (例如柠檬酸钠, 肝素以及 EDTA-K3) 中, 选择使用 EDTA-K3 作为本发明所述试剂盒的测定的血样的抗凝剂。

使用时, 可以按以下步骤操作:

1. 取出所有试剂和血样, 平衡至室温;
2. 病人样本编号, 将病人样本、阳性对照、阴性对照安排到微孔中;
3. 取出所需微孔板条, 其余放回密封袋中封好, 放入冰箱;
4. 用酶稀释液将 HRP 标记的抗细胞抗体 50 倍稀释;

酶稀释液	50uL X (样本数+2, 阴、阳性对照)
HRP 标记的抗细胞抗体	1uL X (样本数+2, 阴、阳性对照)

5. 充分混匀后, 加 50ul 于每一微孔中, 轻拍板架, 使免疫磁性微珠分散;
6. 将抗凝管 (EDTA-K3) 颠倒混匀数次, 按记录单中的安排每孔加入 50ul 血样。用移液器吹打 5-6 次, 使免疫磁性微珠和全血样本充分混匀; 各加 50uL 阳性、阴性对照到相应微

孔中；免疫磁性微珠和全血样本必须混和均匀；

- 7 于室温下反应 10 分钟，期间轻拍框架边缘数次，使试剂与样本维持均匀混合；
- 8 反应时制备洗液，底物液。洗液按每孔 1500ul，用去离子水 20 倍稀释；
- 9 每孔加入 250ul 洗液。利用加入时的冲击力使免疫磁性微珠分散，如发现有聚团，用移液器吹散。将板架放于磁板上，2 分钟；
- 10 用八道移液器在远离磁体的微孔侧壁吸弃上清，留下约 10uL,不要吸干，取下并轻拍板架，使免疫磁性微珠分散；
- 11 重复 9、10 步骤共 5—6 次；
- 12 每孔加入底物 A 液、B 液的混合液 100ul，室温，避光，15 分钟，观察结果；
- 13 如需测量 OD 值，每孔加入 50ul 终止液；
- 14 将板架放于磁板上，使免疫磁性微珠吸于板条侧壁；
- 15 轻轻取下板架，在波长 450nm 下，读取吸光度值（OD）。

专利名称(译)	HLA - B27磁性酶联免疫试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101294957A	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200710027823.3	申请日	2007-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	郭志程		
申请(专利权)人(译)	郭志程		
当前申请(专利权)人(译)	郭志程		
[标]发明人	郭志程		
发明人	郭志程		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
其他公开文献	CN101294957B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种HLA - B27磁性酶联免疫试剂盒，它主要包括酶稀释液，酶结合物，包被有与HLA - B27抗体共价耦联免疫磁性微珠的微孔板板条。该试剂盒制备方法主要包括(A)共价耦联免疫磁性微珠和HLA - B27抗体；(B)酶结合物的制备；(C)包被微孔板。该HLA - B27磁性酶联免疫试剂盒具有快速、简单、准确、成本低等优点。

抗 CD45 酶结合物 OD 值

37°C

4°C

HLA-B27	0.744	0.741	0.835	0.861
非 HLA-B27	0.053	0.067	0.070	0.060