



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106932593 B

(45)授权公告日 2018.03.13

(21)申请号 201710123440.X

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2017.03.03

G01N 33/532(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 马骞

申请公布号 CN 106932593 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(73)专利权人 四川大学华西第二医院

地址 610000 四川省成都市武侯区人民南路3段20号

(72)发明人 王艳云 张林 胡怀忠 陶冶

刘毅 赵毅 周斌

(74)专利代理机构 成都天嘉专利事务所(普通

合伙) 51211

代理人 史姣姣

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

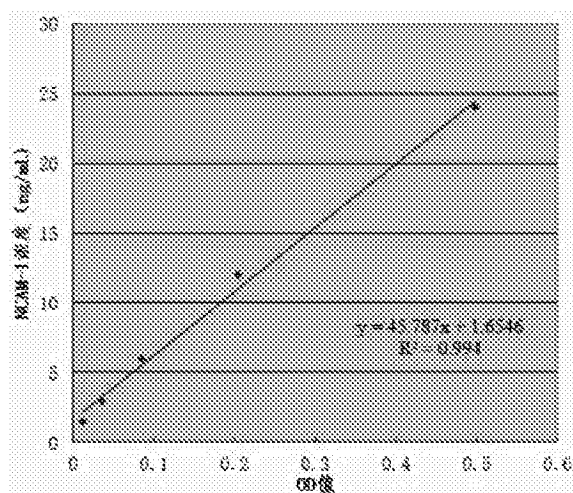
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

以NCAM-1为检测指标的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供一种检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒,所述试剂盒包括包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板、生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液、与生物素标记的NCAM-1多克隆抗体结合的亲和素-辣根过氧化物酶、显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺、终止液硫酸和NCAM-1重组蛋白。该试剂盒通过检测尿液样本中NCAM-1为检测指标,从而判断狼疮肾炎活跃度,实现快速、无创检测。



1. NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,所述试剂盒通过检测尿液样本中NCAM-1作为检测指标,所述NCAM-1在活跃期狼疮肾炎患者尿液中的浓度明显的高于非活跃期狼疮肾炎患者及未合并狼疮肾炎的系统性红斑狼疮患者尿液中的浓度。

2. 根据权利要求1所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述试剂盒包括包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板、生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液、与生物素标记的NCAM-1多克隆抗体结合的亲和素-辣根过氧化物酶、显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺、终止液硫酸和NCAM-1重组蛋白。

3. 根据权利要求2所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板,其每孔包被NCAM-1单克隆抗体0.1~0.2 μ g。

4. 根据权利要求2所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液包括牛血清白蛋白、磷酸盐缓冲液和生物素标记的NCAM-1多克隆抗体。

5. 根据权利要求2所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体由生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯和NCAM-1多克隆抗体耦联而成,生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯与NCAM-1多克隆抗体的分子比率为4:1。

6. 根据权利要求2所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,所述包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板按下述方法制备:先用含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液将NCAM-1单克隆抗体稀释为浓度1 μ g/mL的工作液,然后将稀释后的NCAM-1单克隆抗体工作液加入多孔板的各孔内,在20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C包被12~16小时;包被完成后,将含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液加入多孔板上的各孔,并在20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C进行封闭反应,反应时间为1~4小时;封闭反应结束后,用含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液洗涤多孔板除去多孔板上的未反应物,即获得包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板,于4 $^{\circ}$ C保存;所述含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中,牛血清白蛋白的含量为1g/100mL。

7. 根据权利要求4所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液按下述步骤制备:

(1) 以二甲基亚砜为溶剂,生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯为溶质配制浓度为1 μ g/ μ l的生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;以碳酸盐缓冲液为溶剂,NCAM-1多克隆抗体为溶质配制浓度为1mg/mL的NCAM-1多克隆抗体溶液,

(2) 将步骤(1)制备得到的生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液和NCAM-1多克隆抗体溶液混合,并将得到的混合液在搅拌下于室温反应2~4小时,即获得生物素标记的NCAM-1多克隆抗体;

(3) 将步骤(2)得到的生物素标记的NCAM-1多克隆抗体溶液装入透析袋中,用磷酸盐缓冲液在4 $^{\circ}$ C进行透析,透析时间为12~16小时;

(4) 将步骤(3)透析得到的液体加入1mL的分子筛柱中,以3mL磷酸盐缓冲液缓慢洗脱,收集到的洗脱液中加入适量牛血清白蛋白,使所述牛血清白蛋白的终浓度为1g/100mL,然

后加入50%甘油,即形成生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液,置-20℃保存。

8.根据权利要求4所述的NCAM-1在制备检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液中,所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体的浓度为0.1~0.2 μ g/mL,所述牛血清白蛋白的浓度为1g/100mL。

以NCAM-1为检测指标的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医用检测工具,涉及狼疮肾炎活跃度的检测工具,特别涉及一种以NCAM-1为检测指标的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 狼疮肾炎是系统性红斑狼疮最常见的并发症之一,且狼疮肾炎所导致的终末期肾病是导致系统性红斑狼疮病人死亡的主要因素。而从狼疮肾炎发展为终末期肾病最主要的原因就是因为活跃期的狼疮肾炎没有被及时发现,导致了治疗不及时,肾脏引发不可逆的肾小球硬化以及间质血管纤维化。对于狼疮肾炎活跃度的判断,“金标准”是通过肾脏穿刺活检术对肾脏组织进行病理学检查,根据病理学检查结果进行诊断。而肾脏穿刺活检术为有创性检查,禁忌症较多,无法多次常规进行,因此目前临床上缺乏无创、准确、快捷、安全的检测方法和工具。

[0003] 双抗体夹心酶联免疫吸附法的原理是将特异性抗体结合到固相载体上形成固相抗体,然后和待检血清中的相应抗原结合形成免疫复合物,洗涤后再加酶标记抗体,与免疫复合物中抗原结合形成酶标抗体-抗原-固相抗体复合物,加底物显色,判断抗原含量。

[0004] NCAM-1(Neural cell adhesion molecule-1,中文名:神经细胞粘附分子-1)是一种非钙依赖性粘附因子,在细胞信号识别及传导、神经再生等方面都具有一定的作用。

发明内容

[0005] 发明人在长期的研究中发现,NCAM-1在活跃期狼疮肾炎患者尿液中的浓度明显的高于非活跃期狼疮肾炎患者及未合并狼疮肾炎的系统性红斑狼疮患者尿液中的浓度,因此,基于这一研究结果,NCAM-1可作为狼疮肾炎患者肾炎活跃度的诊断指标应用于检测试剂盒中。

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术通过穿刺活检术检测狼疮肾炎活跃度的不足,提供一种的新的可用于检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒,该试剂盒通过检测尿液样本中NCAM-1为检测指标,从而判断狼疮肾炎活跃度,实现快速、无创检测。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 本发明首次将NCAM-1作为检测指标,特定的应用到双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒中,得到双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒通过检测尿液样本中的NCAM-1作为判断狼疮肾炎活跃度的依据。

[0009] 上述所述的检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板、生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液、与生物素标记的NCAM-1多克隆抗体结合的亲和素-辣根过氧化物酶、显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺、终止液硫酸和NCAM-1重组蛋白。

[0010] 优选,所述包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板,其每孔包被NCAM-1单克隆抗体0.1~0.2 μ g。

[0011] 进一步的,所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液包括生物素标记的NCAM-1多克隆抗体、牛血清白蛋白和磷酸盐缓冲液;检测液中,所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体的最终浓度为0.1~0.2 μ g/mL,牛血清白蛋白的最终浓度为1g/100mL。

[0012] 进一步的,所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体由生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯和NCAM-1多克隆抗体耦联而成,所述生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯与NCAM-1多克隆抗体的分子比率为4:1。

[0013] 进一步的,所述包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板按下述方法制备:先用牛血清白蛋白浓度为1g/100mL的磷酸盐缓冲液将NCAM-1单克隆抗体稀释为浓度1 μ g/mL的工作液,然后将所述NCAM-1单克隆抗体工作液按100~200 μ l/孔的量加入多孔板的各孔内,在20℃~25℃包被12~16小时;包被完成后,将含牛血清白蛋白1g/100mL的磷酸盐缓冲液加入多孔板上的各孔,加入量为200 μ l/孔,并在20℃~25℃进行封闭反应,反应时间为1~4小时;封闭反应结束后,用含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液洗涤多孔板除去多孔板上的未反应物,即获得包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板,于4℃保存。

[0014] 本发明进一步提供了所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液的制备方法,所述方法包括下述步骤:

[0015] (1)以二甲基亚砜为溶剂,生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯为溶质配制浓度为1 μ g/ μ l的生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;以碳酸盐缓冲液为溶剂,NCAM-1多克隆抗体为溶质配制浓度为1mg/mL的NCAM-1多克隆抗体溶液,

[0016] (2)将步骤(1)制备得到的生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液和NCAM-1多克隆抗体溶液混合,并将得到的混合液在搅拌下于室温反应2~4小时,即获得生物素标记的NCAM-1多克隆抗体;

[0017] (3)将步骤(2)得到的含生物素标记的NCAM-1多克隆抗体溶液装入透析袋中,用磷酸盐缓冲液在4℃进行透析,透析时间为12~16小时;

[0018] (4)将步骤(3)透析得到的液体加入到1mL的分子筛柱中,以3mL磷酸盐缓冲液缓慢洗脱,收集到的洗脱液中加入适量牛血清白蛋白,使得牛血清白蛋白的终浓度为1g/100mL,然后加入牛血清蛋白和洗脱液总体积的50%甘油,即形成生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液,置-20℃保存。

[0019] 本发明具有以下有益效果:

[0020] 1、本发明为狼疮肾炎患者检测肾炎活跃度提供了一种采用新检测指标的新型检测工具。

[0021] 2、使用本发明的检测试剂盒,操作简单,检测一个样品仅需3~6分钟,与临床上现有检测方法相比,检测效率大幅度提高。由于检测样品为患者的尿液样本,因而是一种无创检测。

[0022] 3、本发明所述检测工具结构简单,易于加工制作,生产成本低,便于工业化生产。

附图说明

[0023] 图1为实施例3的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施方式详细说明本发明。

[0025] 下述实施例中：

[0026] 鼠抗人NCAM-1单克隆抗体、羊抗人NCAM-1多克隆抗体和NCAM-1重组蛋白购自美国bio-technique公司。

[0027] 甘油、二甲基亚砜，生物素N-羧基琥珀酰亚胺酯、牛血清白蛋白分别购自sigma-aldrich公司和索莱宝公司。

[0028] 磷酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液可自制，制备方法如下：

[0029] 1.磷酸盐缓冲液：称取8g氯化钠、0.2g氯化钾、1.44g磷酸氢二钠和0.24g磷酸二氢钾溶于900mL双蒸水中，用盐酸调节溶液pH值至7.2，最后加入双蒸水定容至1L，溶液通过0.45μm滤膜过滤后保存于4℃冰箱中。

[0030] 2.碳酸盐缓冲液：称取63.6g碳酸钠和33.6g碳酸氢钠溶于1L双蒸水中，用盐酸调节溶液pH值为8.0的碳酸盐缓冲液，溶液通过0.45μm滤膜过滤后保存于4℃冰箱中。

[0031] 实施例1

[0032] 检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒，所述试剂盒包括包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板、生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液、与生物素标记的NCAM-1多克隆抗体结合的亲和素-辣根过氧化物酶、显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺、终止液硫酸和NCAM-1重组蛋白。

[0033] 本实施例中，所述包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板，其每孔包被NCAM-1单克隆抗体0.1μg。

[0034] 本实施例中，所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液包括生物素标记的NCAM-1多克隆抗体、牛血清白蛋白和磷酸盐缓冲液，在得到的检测液中，生物素标记的NCAM-1多克隆抗体和牛血清白蛋白的浓度分别0.1μg/mL和1g/100mL。

[0035] 本实施例中，所述生物素标记的NCAM-1多克隆抗体由生物素N-羧基琥珀酰亚胺酯和NCAM-1多克隆抗体耦联而成，所述生物素N-羧基琥珀酰亚胺酯与NCAM-1多克隆抗体的分子比率为4:1。

[0036] 实施例2

[0037] 本实施例与实施例1的区别：

[0038] 本实施例中，所述包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板，其每孔包被NCAM-1单克隆抗体0.2μg。在得到的检测液中，生物素标记的NCAM-1多克隆抗体的浓度分别0.2μg/mL。

[0039] 实施例3

[0040] 本实施例在实施例1的基础上，进一步提供实施例1中的包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板的制备方法和生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液的制备方法；

[0041] 其中，包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板的制备方法：先用含牛血清白蛋白1g/100mL的磷酸盐缓冲液将NCAM-1单克隆抗体稀释为浓度1μg/mL的工作液，然后将所述NCAM-1单克隆抗体工作液按100μL/孔的量加入多孔板的各孔内，在20℃包被12小时；包被完成后，将含牛血清白蛋白1g/100mL的磷酸盐缓冲液加入多孔板上的各孔，加入量为200μL/孔，并在20℃进行封闭反应，反应时间为1小时；封闭反应结束后，用含0.05%吐温20的磷酸盐缓

冲液洗涤多孔板除去多孔板上的未反应物,即获得包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板,于4℃保存。

[0042] 生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液的制备方法:

[0043] (1)以二甲基亚砜为溶剂,生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯为溶质配制浓度为1 μ g/ μ l的生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;以碳酸盐缓冲液为溶剂,NCAM-1多克隆抗体为溶质配制浓度为1mg/mL的NCAM-1多克隆抗体溶液,

[0044] (2)将步骤(1)制备得到的生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液和NCAM-1多克隆抗体溶液混合,并将得到的混合液在搅拌下于室温反应2小时,即获得生物素标记的NCAM-1多克隆抗体;

[0045] (3)将步骤(2)得到的含生物素标记的NCAM-1多克隆抗体溶液装入透析袋中,用磷酸盐缓冲液在4℃进行透析,透析时间为12小时;

[0046] (4)将步骤(3)透析得到的液体加入到体积为1mL分子筛柱中,以3mL磷酸盐缓冲液缓慢洗脱,收集到的洗脱液中加入适量牛血清白蛋白,使得牛血清白蛋白的终浓度为1g/100mL,然后加入牛血清蛋白和洗脱液总体积的50%甘油,即形成生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液,置-20℃保存。

[0047] 实施例4

[0048] 本实施例在实施例2的基础上,进一步提供实施例2中的包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板的制备方法和生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液的制备方法;

[0049] 在多孔板的制备中,其方法与实施例3的区别在于:所述NCAM-1单克隆抗体工作液按200 μ L/孔的量加入多孔板的各孔内,在25℃包被16小时;包被完成后,加入含牛血清白蛋白1g/100mL的磷酸盐缓冲液后在25℃进行封闭反应,反应时间为4小时;

[0050] 在生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液制备中,其制备方法与实施例3的区别在于:

[0051] 步骤(2)中,混合液在搅拌下于室温反应时间为4小时;

[0052] 步骤(3)中,透析时间为16小时。

[0053] 上述实施例1-4中,NCAM-1单克隆抗体选用鼠抗人NCAM-1单克隆抗体, NCAM-1多克隆抗体选用羊抗人NCAM-1多克隆抗体。

[0054] 本发明的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒的使用与现有技术使用方法一致。使用本发明实施例1-4中得到的试剂盒对临床确诊狼疮肾炎活跃期和临床确诊狼疮肾炎非活跃期患者进行采样检测,加入终止液变黄色为阳性(狼疮肾炎活跃期),并将检测结果统计在下表1中,检测结果表明:该检测工具的灵敏性可达81%左右,特异性可达80%左右。

[0055] 表1

[0056]

指标	灵敏度	特异度
实施例 1	70%	80%
实施例 2	72%	81%
实施例 3	81%	69%
实施例 4	83%	71%

[0057] 本发明将实施例3的试剂盒绘制标准曲线,其标准曲线如图1所示,由标准曲线可知本发明试剂盒工作正常,结果较为可靠。

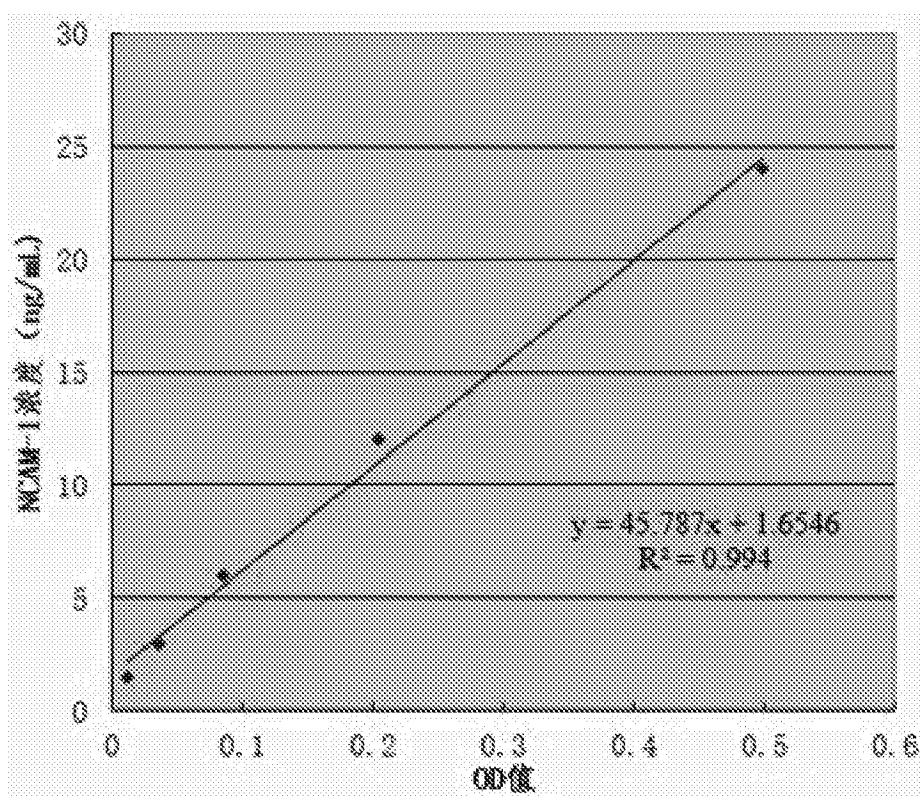


图1

专利名称(译)	以NCAM-1为检测指标的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106932593B	公开(公告)日	2018-03-13
申请号	CN201710123440.X	申请日	2017-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学华西第二医院		
申请(专利权)人(译)	四川大学华西第二医院		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学华西第二医院		
[标]发明人	王艳云 张林 胡怀忠 陶冶 刘毅 赵毅 周斌		
发明人	王艳云 张林 胡怀忠 陶冶 刘毅 赵毅 周斌		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/6893 G01N2333/70525 G01N2800/104		
审查员(译)	马骞		
其他公开文献	CN106932593A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测狼疮肾炎活跃度的双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒，所述试剂盒包括包被有NCAM-1单克隆抗体的多孔板、生物素标记的NCAM-1多克隆抗体检测液、与生物素标记的NCAM-1多克隆抗体结合的亲和素-辣根过氧化物酶、显色底物3', 3', 5', 5'-四甲基联苯胺、终止液硫酸和NCAM-1重组蛋白。该试剂盒通过检测尿液样本中NCAM-1为检测指标，从而判断狼疮肾炎活跃度，实现快速、无创检测。

