

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810226188.6

[43] 公开日 2009 年 4 月 8 日

[11] 公开号 CN 101403749A

[22] 申请日 2008.11.17

[21] 申请号 200810226188.6

[71] 申请人 北京大学

地址 100191 北京市海淀区学院路 38 号北京
大学医学部免疫学系中心楼 715

[72] 发明人 高晓明 戴 慧 董红亮 龙 锴
张 岩 徐晓军

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅 任凤华

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 6 页

[54] 发明名称

通过葡聚糖特异性抗体辅助诊断自身免疫性
疾病的试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了通过葡聚糖特异性抗体辅助诊断自身免疫性疾病的试剂盒。本发明公开的辅助诊断系统性红斑狼疮的 ELISA 试剂盒和类风湿性关节炎的 ELISA 试剂盒，均包括用于包被的抗原；所述用于包被的抗原可为 $\alpha-1, 4$ -葡聚糖，优选黄芪多糖；所述用于包被的抗原也可为 $\alpha-1, 6$ -葡聚糖，优选右旋糖苷。本发明的试剂盒可以用于辅助诊断系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎，具有重要的应用价值。

1、一种辅助诊断系统性红斑狼疮的 ELISA 试剂盒，包括用于包被的抗原；所述用于包被的抗原为 α -1, 4-葡聚糖，优选黄芪多糖；所述用于包被的抗原为 α -1, 6-葡聚糖，优选右旋糖苷。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括酶标的二抗；所述酶标的二抗是抗人 IgG。

3、如权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标的二抗是山羊抗人 IgG、兔抗人 IgG 或鼠抗人 IgG。

4、如权利要求 1 至 3 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括如下试剂：牛血清白蛋白、PBS 缓冲液、PBST 溶液、PBST-BSA 溶液、OPD-磷酸柠檬酸缓冲液、硫酸和 96 孔酶标板；所述 PBS 缓冲液的浓度为 0.15mol/L，pH 为 7.2；所述 PBST 溶液为在所述 PBS 缓冲液中加入 Tween 20 得到的溶液，所述 Tween 20 和所述 PBS 缓冲液的体积比为 0.05%；所述 PBST-BSA 溶液为在所述 PBST 缓冲液中加入牛血清白蛋白得到的溶液，所述牛血清白蛋白的终浓度为 1 克/L；所述 OPD-磷酸柠檬酸缓冲液为在磷酸柠檬酸缓冲液加入磷苯二胺得到的溶液，所述邻苯二胺的质量百分比浓度为 0.06%，所述磷酸柠檬酸缓冲液的 pH 为 5.0，磷酸的浓度为 0.1mol/L，柠檬酸的浓度为 0.05mol/L。

5、一种辅助诊断类风湿性关节炎的 ELISA 试剂盒，包括用于包被的抗原；所述用于包被的抗原为 α -1, 4-葡聚糖，优选黄芪多糖；所述用于包被的抗原为 α -1, 6-葡聚糖；优选右旋糖苷。

6、如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括酶标的二抗；所述酶标的二抗是抗人 IgG。

7、如权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标的二抗是山羊抗人 IgG、兔抗人 IgG 或鼠抗人 IgG。

8、如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：所述用于包被的抗原为 α -1, 4-葡聚糖，所述试剂盒还包括酶标的二抗；所述酶标的二抗是抗人 IgA。

9、如权利要求 8 所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标的二抗是山羊抗人 IgA、兔抗人 IgA 或鼠抗人 IgA。

10、如权利要求 5 至 9 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括如下试剂：牛血清白蛋白、PBS 缓冲液、PBST 溶液、PBST-BSA 溶液、OPD-磷酸柠檬酸缓冲液、硫酸和 96 孔酶标板；所述 PBS 缓冲液的浓度为 0.15mol/L，pH 为 7.2；所述 PBST 溶

液为在所述PBS缓冲液中加入Tween 20得到的溶液，所述Tween 20和所述PBS缓冲液的体积比为0.05%；所述PBST-BSA溶液为在所述PBST缓冲液中加入牛血清白蛋白得到的溶液，所述牛血清白蛋白的终浓度为1克/L；所述OPD-磷酸柠檬酸缓冲液为在磷酸柠檬酸缓冲液加入磷苯二胺得到的溶液，所述邻苯二胺的质量百分比浓度为0.06%，所述磷酸柠檬酸缓冲液的pH为5.0，磷酸的浓度为0.1mol/L，柠檬酸的浓度为0.05mol/L。

通过葡聚糖特异性抗体辅助诊断自身免疫性疾病的试剂盒

技术领域

本发明涉及通过葡聚糖特异性抗体辅助诊断自身免疫性疾病的试剂盒。

背景技术

免疫系统最基本的功能是识别自我与非我，进而达到保护自身免受外界病原微生物侵扰的目的。自身免疫是机体免疫系统对自身成分发生免疫应答的能力，这种现象存在于所有个体。在正常情况下的自身免疫应答并不引起病理性损伤；但在某些条件下免疫系统仍然会对自身细胞或组织成分产生过度免疫应答，造成自身组织或器官炎症性损伤，这种机体对自身成分发生过度免疫应答而导致的疾病状态称之为自身免疫病。自身免疫病可分为器官特异性自身免疫病和全身性自身免疫病。与其它疾病相比，自身免疫病的特点包括：①患者体内可检测到自身抗体或自身反应性 T 细胞；②病情的进程与自身免疫反应强度密切相关；③多为慢性进行性疾病，反复发作，慢性迁延，严重影响患者的工作能力和生活质量；④有明显的遗传倾向和性别趋向，女性病人较男性病人为多；⑤有不同的诱因，病的表现形式也复杂多样。

健康人血清中含有天然自身抗体，包括 IgM，IgG 和 IgA，其识别对象包括 DNA、肌动蛋白以及 IgG 等。天然抗体的产生并不依赖于外源性抗原的刺激，这些抗体的产生有可能源自于胃肠道内的常驻菌丛诱导产生的，也可能与机体本身死亡的自身反应性 B1 细胞有关，这些自身抗体与自身抗原的亲和力相对较低并具有交叉反应性。与正常人自身抗体不同，引起自身免疫病造成病理性损伤的自身抗体的特异性较强，与自身抗原亲和力较高，多数抗体为 IgG，它们也是受抗原刺激产生的。研究表明，自生抗体可通过多种机制使机体造成病理损伤，这些机制包括：①抗体介导的细胞毒作用：自身抗体与细胞表面的自身抗原相结合，通过调理作用使靶细胞黏附于吞噬细胞表面进而被吞噬裂解；②抗体的中合作用：自生抗体与体内有生物活性的抗原或受体结合，使其灭活或丧失功能而导致病理反应症状的出现。作为自身免疫病之一的重症肌无力患者体内出现的抗乙酰胆碱受体抗体就是这一作用机制的典型代表。③自身抗体与抗原结合形成免疫复合物而造成组织损伤：自身抗体与处于游离状态的抗原结合形成免疫复合物，在一定的条件下沉积于局部

或全身血管壁基底膜或组织间隙；免疫复合物可激活补体而引起炎症反应。系统性红斑狼疮就体现这一发病特点。系统性红斑狼疮患者体内抗 DNA 抗体在皮下、关节和肾小球基底膜等处沉积造成炎症反应；④激活细胞表面受体而引起自身免疫病：毒性弥漫性甲状腺肿是由血清中促甲状腺激素受体特异性自身抗体引起的自身免疫病，患者体内的自身抗体持续作用于甲状腺细胞的 TSH 受体，刺激甲状腺细胞分泌过多的甲状腺素而引起患者甲状腺机能亢进。天然自身抗体可能具有一定的生理功能，而在病理状态下自身抗体却会引起自身免疫病；也有一些自身抗体本身一般不引起自身免疫病，但对于一些疾病的辅助诊断可提供帮助，如自身抗线粒体抗体对原发性胆管硬化有辅助诊断意义。

自身抗体水平已成为诊断自身免疫病的重要指标之一。比如，系统性红斑狼疮（Systemic Lupus Erythematosus，SLE）是一种涉及许多系统和脏器的自身免疫性疾病，由于细胞和体液免疫功能障碍，产生多种自身抗体。可累及皮肤、浆膜、关节、肾和中枢神经系统等，并以自身免疫为特征，患者体内存在多种自身抗体，不仅影响体液免疫，亦影响细胞免疫，补体系统也有变化；发病机理主要是由于免疫复合物形成；病情呈反复发作与缓解交替过程；此病以青年女性多见；我国患病率高于西方国家，可能与遗传因素有关。自身抗体的异常是系统性红斑狼疮的重要诊断指标。

在临床内科疾病中，自身免疫类疾病的误诊率和漏诊率是较高的，主要原因主要包括自身免疫类疾病发病较隐匿；临床表现不明确易与其它内外科疾病相混淆；病程长，往往确诊时疾病已到较严重阶段。另外自身免疫类疾病的诊断标准以评分式为主，有一定的主观因素，缺乏能够直接作为诊断标准的实验室指标。这些诊断上的困难直接导致治疗的延误和预后差。因此，灵敏而特异的实验室指标对于自身免疫类疾病的正确诊断、早期发现和预后评估非常重要。比如，对于系统性红斑狼疮和类风湿关节炎，目前常用的实验室诊断指标为抗核抗体和类风湿因子，但是它们依然有很高的漏检率和错检率，所以寻找并鉴定新的实验室指标用来诊断或辅助诊断自身免疫类疾病是很重要的。

多糖是由10个以上单糖聚合而成的大分子，分子量由数万至数百万，是构成生命活动的四大基本物质之一，与多种生理功能密切相关。

葡聚糖是最具生理活性的一种多糖，由D-吡喃葡萄糖单体组成，广泛存在于微生物、植物和动物中。

为评价一个指标在诊断疾病中的应用价值,需要对这一指标的敏感性、特异性分别作出检验,只有同时具备很高的敏感性和特异性才能作为诊断指标。用统计学的方法同时检测敏感性和特异性即为ROC曲线,ROC曲线又称受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve),是反映检测指标敏感性和特异性连续变量的综合指标。计算ROC曲线下面积AUC来评价诊断效率,面积大于0.5可认为该指标有诊断意义,面积越大,判断价值越高。

发明内容

本发明的目的是提供通过葡聚糖特异性辅助诊断自身免疫性疾病的试剂盒。

本发明提供的辅助诊断系统性红斑狼疮(SLE)的ELISA试剂盒,包括用于包被的抗原;所述用于包被的抗原可为 α -1,4-葡聚糖,优选黄芪多糖;所述用于包被的抗原还可为 α -1,6-葡聚糖,优选右旋糖苷。

所述试剂盒还可包括酶标的二抗;所述酶标的二抗是抗人IgG。

所述酶标的二抗可为任何抗人IgG,如山羊抗人IgG、兔抗人IgG或鼠抗人IgG。

所述试剂盒还包括ELISA常规试剂,如如下试剂:牛血清白蛋白、PBS缓冲液、PBST溶液、PBST-BSA溶液、OPD-磷酸柠檬酸缓冲液、硫酸和96孔酶标板;所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L, pH为7.2;所述PBST溶液为在所述PBS缓冲液中加入Tween 20得到的溶液,所述Tween 20和所述PBS缓冲液的体积比为0.05%;所述PBST-BSA溶液为在所述PBST缓冲液中加入牛血清白蛋白得到的溶液,所述牛血清白蛋白的终浓度为1克/L;所述OPD-磷酸柠檬酸缓冲液为在磷酸柠檬酸缓冲液加入邻苯二胺得到的溶液,所述邻苯二胺的质量百分比浓度为0.06%,所述磷酸柠檬酸缓冲液的pH为5.0,磷酸的浓度为0.1mol/L,柠檬酸的浓度为0.05mol/L。

本发明提供的辅助诊断类风湿性关节炎(RA)的ELISA试剂盒,包括用于包被的抗原;所述用于包被的抗原可为 α -1,4-葡聚糖,优选黄芪多糖;所述用于包被的抗原还可为 α -1,6-葡聚糖,优选右旋糖苷。

所述试剂盒还可包括酶标的二抗;所述酶标的二抗是抗人IgG。

所述酶标的二抗可为任何抗人IgG,如山羊抗人IgG、兔抗人IgG或鼠抗人IgG。

当所述用于包被的抗原为 α -1,4-葡聚糖时,所述试剂盒还可包括酶标的二抗;所述酶标的二抗是抗人IgA。

所述酶标的二抗可为任何抗人IgA,如山羊抗人IgA、兔抗人IgA或鼠抗人IgA。

所述试剂盒还包括ELISA常规试剂,如如下试剂:牛血清白蛋白、PBS缓冲液、

PBST溶液、PBST-BSA溶液、OPD-磷酸柠檬酸缓冲液、硫酸和96孔酶标板；所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L，pH为7.2；所述PBST溶液为在所述PBS缓冲液中加入Tween 20得到的溶液，所述Tween 20和所述PBS缓冲液的体积比为0.05%；所述PBST-BSA溶液为在所述PBST缓冲液中加入牛血清白蛋白得到的溶液，所述牛血清白蛋白的终浓度为1克/L；所述OPD-磷酸柠檬酸缓冲液为在磷酸柠檬酸缓冲液加入磷苯二胺得到的溶液，所述邻苯二胺的质量百分比浓度为0.06%，所述磷酸柠檬酸缓冲液的pH为5.0，磷酸的浓度为0.1mol/L，柠檬酸的浓度为0.05mol/L。

本发明研究了血清抗体和细胞表面受体对 α -葡聚糖免疫识别特点，结果表明 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgG在SLE病人和RA病人中滴度明显升高， α -1,6葡聚糖特异性抗体IgG在SLE病人和RA病人中滴度明显升高， α -1,4葡聚糖特异性抗体IgA在RA病人中滴度明显升高。SLE病人体内的 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgG的ROC曲线下面积AUC达到0.9839、RA病人体内的 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgG的ROC曲线下面积AUC达到0.7989、SLE病人体内的 α -1,6葡聚糖特异性抗体IgG的ROC曲线下面积AUC达到0.8633、RA病人体内的 α -1,6葡聚糖特异性抗体IgG的ROC曲线下面积AUC达到0.7800、RA病人体内的 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgA的ROC曲线下面积AUC达到0.67。本发明的试剂盒可以用于辅助诊断系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎，具有重要的应用价值。

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。

附图说明

图1为检测SLE病人体内的 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgG。

图2为实施例1的试剂盒的ROC曲线。

图3为实施例1的试剂盒检测SLE疾病的灵敏性。

图4为检测RA病人体内的 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgG。

图5为实施例2的试剂盒的ROC曲线。

图6为实施例2的试剂盒检测RA疾病的灵敏性。

图7为检测SLE病人体内的 α -1,6葡聚糖特异性抗体IgG。

图8为实施例3的试剂盒的ROC曲线。

图9为检测RA病人体内的 α -1,6葡聚糖特异性抗体IgG。

图10为实施例4的试剂盒的ROC曲线。

图11为检测RA病人体内的 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgA。

图 12 为实施例 5 的试剂盒的 ROC 曲线。

具体实施方式

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

实施例1、SLE检测试剂盒的制备和应用

一、试剂盒的制备

试剂盒的组成如下：

黄芪多糖 (APS)：购自Pharmagenesis公司，由D-glucose组成，主链通过 α -1, 4-糖甙键连接，侧链通过 α -1, 6-糖甙键连接。

辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗人IgG：购自SBA公司；

牛血清白蛋白 (BSA)：购自Hyclone公司；

PBS缓冲液：PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L，pH为7.2；

PBST溶液：在上述PBS缓冲液中加入Tween 20， Tween 20和PBS缓冲液的体积比为0.05%；

PBST-BSA溶液：在上述PBST溶液中加入牛血清白蛋白 (BSA)，牛血清白蛋白的终浓度为1克/L；

OPD-磷酸柠檬酸缓冲液 (pH 9.6)：在磷酸柠檬酸缓冲液加入磷苯二胺，邻苯二胺的质量百分比浓度为0.06；所述磷酸柠檬酸缓冲液的 pH为5.0，磷酸的浓度为0.1mol/L，柠檬酸的浓度为0.05mol/L；

硫酸；

96孔酶标板：Costar公司。

二、试剂盒的应用

应用步骤一制备的试剂盒辅助诊断SLE疾病。

1、血清采集

分别收集以下3组人群的血清：

第一组 (SLE)：确诊的30例SLE病人，符合美国风湿病协会诊断标准，且为活动期病人；

第二组 (NS)：随机选取30例健康人，作为阴性对照；

第三组 (CA)：确诊的30例肿瘤病人，其中，肺癌病人 (7人)、白血病人 (4人)、宫颈癌病人 (6人)、卵巢癌病人 (7人)、子宫内膜癌病人 (6人)。

2、检测

用APS包被ELISA板，分别检测3组人群血清中的APS特异性抗体IgG。具体方法如下：

- 1) 用APS (50 μg/ml) 作为抗原包被96孔酶标板，每孔100 μl，4℃过夜，PBST溶液洗5次；
- 2) 2% BSA 37℃封闭2 h，PBST溶液洗5次；
- 3) 每孔分别加入100μl用PBST-BSA溶液稀释的稀释度为1:200的30例健康人血清（HDS）、稀释度为1:200的30例肿瘤病人血清、稀释度为1:200的30例SLE病人血清，37℃孵育2 h，PBST溶液洗5次；
- 4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgG，37℃孵育1 h，PBST溶液洗5次；OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色，12.5%硫酸溶液终止反应，读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。在全部实验中健康人对照组的OD读数控制在0.2-0.3，其它2组的吸光度读数均除以对照组读数得到结合指数(binding index)，所有显示结果均以结合指数来表示。各组人群之间抗体水平用*Student' s t test*比较差别。另外，设定健康人组平均抗体水平加3倍标准差后的读数作为判断阳性的截断值(cut-off value)，并以此计算各组阳性率。各组人群之间的阳性率用 *Fisher' s exact*检验比较差别。

3组人群的APS特异性抗体IgG水平见图1。3组人群的阳性率见表1。

表1 不同人群中抗α-1, 4-葡聚糖IgG抗体阳性率比较

HS组	SLE组	CA组
3.3%	86.7% (<0.0001)	6.7% (0.388)

结果表明：健康人与肿瘤病人血清中没有IgG抗体，但多数SLE病人血清中IgG抗体水平明显提高。SLE病人血清抗体水平与健康人血清抗体水平相比有统计学差异($p<0.0001$)，而肿瘤病人血清抗体水平与健康人血清抗体水平无统计学差异。SLE病人血清抗体阳性率水平与健康人血清抗体阳性率水平相比有统计学差异，而肿瘤病人血清抗体阳性率水平与健康人血清抗体阳性率水平无统计学差异。

3、试剂盒的应用价值评价

ROC曲线又称受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve)，是反映检测指标敏感性和特异性连续变量的综合指标。计算ROC曲线下

积AUC可以评价诊断效率，面积大于0.5可认为该指标有诊断意义，面积越大判断价值越高。

为评价步骤一制备的试剂盒在诊断SLE中的应用价值，根据病人组和对照组的抗体水平绘制ROC曲线，见图2。结果表明：曲线下面积AUC达到0.9839，证明本试剂盒在诊断SLE中的有一定应用价值。

三、试剂盒的灵敏性测定

从30例SLE病人血清中分别选取三个识别强度较高的样本，与30例正常人血清样本一起做血清稀释度检测实验。

1) 用APS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作为抗原包被96孔酶标板，每孔100 μl ，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，PBST溶液洗5次；

2) 2% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h，PBST溶液洗5次；

3) 每孔分别加入100 μl 用PBST-BSA溶液稀释的不同稀释度(1/50、1/100、1/200、1/400、1/800、1/1600)的30例健康人血清(HDS)、三个识别强度较高的样本，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h，PBST溶液洗5次；

4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgG，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h，PBST溶液洗5次；OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色，12.5%硫酸溶液终止反应，读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。结果见图3。

结果表明，SLE病人血清(SLE-2、SLE-21、SLE-30)在血清稀释度为1:800时仍对APS有明显的识别，与正常人血清(N40)形成显著差别。

实施例2、RA检测试剂盒的制备和应用

一、试剂盒的制备

同实施例1的步骤一。

二、试剂盒的应用

应用步骤一制备的试剂盒辅助检测RA疾病。

1、血清采集

分别收集以下3组人群的血清：

第一组(RA)：确诊的30例RA病人，符合美国风湿病协会诊断标准，且为活动期病人；

第二组(HS)：随机选取30例健康人，作为阴性对照；

第三组（CA）：确诊的30例肿瘤病人，其中，肺癌病人（7人）、白血病人（4人）、宫颈癌病人（6人）、卵巢癌病人（7人）、子宫内膜癌病人（6人）。

2、检测

用APS包被ELISA板，分别检测3组人群血清中的APS特异性抗体IgG。具体方法如下：

1) 用APS（50 $\mu\text{g/ml}$ ）作为抗原包被96孔酶标板，每孔100 μl ，4℃过夜，PBST溶液洗5次；

2) 2% BSA 37℃封闭2 h，PBST溶液洗5次；

3) 每孔加入100 μl 用PBST-BSA溶液稀释的稀释度为1:200的30例健康人血清（HDS）、稀释度为1:200的30例肿瘤病人血清、稀释度为1:200的30例RA病人血清，37℃孵育2 h，PBST溶液洗5次；

4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgG，37℃孵育1 h，PBST溶液洗5次；OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色，12.5%硫酸溶液终止反应，读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。在全部实验中健康人对照组的OD读数控制在0.2-0.3，其它2组的吸光度读数均除以对照组读数得到结合指数(binding index)，所有显示结果均以结合指数来表示。各组人群之间抗体水平用*Student's t test*比较差别。另外，设定健康人组平均抗体水平加3倍标准差后的读数作为判断阳性的截断值(cut-off value)，并以此计算各组阳性率。各组人群之间的阳性率用*Fisher's exact*检验比较差别。

3组人群的APS特异性抗体IgG水平见图4。3组人群的阳性率见表2。

表2 不同人群中抗 α -1, 4-葡聚糖IgG抗体阳性率比较

HS组	RA组	CA组
3.3%	50% (<0.0005)	6.7% (0.388)

结果表明：健康人与肿瘤病人血清中没有IgG抗体，但多数RA病人血清中IgG抗体水平明显提高。RA病人血清抗体水平与正常人血清抗体水平相比均有统计学差异($p<0.0005$)，而肿瘤病人血清抗体水平与正常人血清抗体水平无统计学差异。RA病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平相比有统计学差异，而肿瘤病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平无统计学差异。

3、试剂盒的应用价值评价

ROC曲线又称受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve), 是反映检测指标敏感性和特异性连续变量的综合指标。计算ROC曲线下面积AUC可以评价诊断效率, 面积大于0.5可认为该指标有诊断意义, 面积越大判断价值越高。

为评价步骤一制备的试剂盒在诊断RA中的应用价值, 根据病人组和对照组的抗体水平绘制ROC曲线, 见图5。结果表明: 曲线下面积AUC达到0.7989, 证明本试剂盒在诊断RA中的有一定应用价值。

三、试剂盒的灵敏性测定

从30例RA病人血清中分别选取三个识别强度较高的样本, 与30例正常人血清样本一起做血清稀释度检测实验。

1) 用APS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作为抗原包被96孔酶标板, 每孔100 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST溶液洗5次;

2) 2% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h, PBST溶液洗5次;

3) 每孔分别加入100 μl 用PBST-BSA溶液稀释的不同稀释度(1/50、1/100、1/200、1/400、1/800、1/1600) 的30例健康人血清(HDS)、三个识别强度较高的样本, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, PBST溶液洗5次;

4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBST溶液洗5次; OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色, 12.5%硫酸溶液终止反应, 读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。结果见图6。

结果表明, RA病人血清(RA-15、RA-22、RA-11) 在血清稀释度为1:400 时仍对APS有明显的识别, 与正常人血清(N40) 形成显著差别。

实施例3、SLE检测试剂盒的制备和应用

一、试剂盒的制备

右旋糖酐(17-0280-01): 购自Sigma公司, 右旋糖酐是由 α -1,6-糖苷键连接组成的直链型 α -葡聚糖。

辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗人IgG: 购自SBA公司;

牛血清白蛋白(BSA): 购自Hyclone公司;

PBS缓冲液: PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L, pH为7.2;

PBS-T溶液：在上述PBS缓冲液中加入Tween 20， Tween 20和PBS缓冲液的体积比为0.05%；

PBST-BSA溶液：在上述PBST溶液中加入牛血清白蛋白（BSA），牛血清白蛋白的终浓度为1克/L；

OPD-磷酸柠檬酸缓冲液（pH 9.6）：在磷酸柠檬酸缓冲液加入磷苯二胺，邻苯二胺的质量百分比浓度为0.06%；所述磷酸柠檬酸缓冲液的pH为5.0，磷酸的浓度为0.1mol/L，柠檬酸的浓度为0.05mol/L；

硫酸；

96孔酶标板：Costar公司。

二、试剂盒的应用

应用步骤一制备的试剂盒辅助检测SLE疾病。

1、血清采集

同实施例1的步骤二的2。

2、检测

用右旋糖酐包被ELISA板，分别检测3组人群血清中的右旋糖酐特异性抗体IgG。具体方法如下：

1) 用右旋糖酐（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）作为抗原包被96孔酶标板，每孔100 μl ，4℃过夜，PBST溶液洗5次；

2) 2% BSA 37℃封闭2 h，PBST溶液洗5次；

3) 每孔分别加入100 μl 用PBST-BSA溶液稀释的稀释度为1:200的30例健康人血清、稀释度为1:200的30例肿瘤病人血清、稀释度为1:200的30例SLE病人血清，37℃孵育2 h，PBST溶液洗5次；

4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgG，37℃孵育1 h，PBST溶液洗5次；OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色，12.5%硫酸溶液终止反应，读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。在全部实验中健康人对照组的OD读数控制在0.2-0.3，其它2组的吸光度读数均除以对照组读数得到结合指数(binding index)，所有显示结果均以结合指数来表示。各组人群之间抗体水平用Student's t test比较差别。另外，设定健康人组平均抗体水平加3倍标准差后的读数作为判断阳性的截断值(cut-off value)，并以此计算各组阳性率。各组人群之间的阳性率用Fisher's exact检验比较差别。

3组人群的右旋糖酐特异性抗体IgG水平见图7。3组人群的阳性率见表3。

表3 不同人群中抗 α -1, 6-葡聚糖IgG抗体阳性率比较

HS组	SLE组	CA组
6. 7%	73. 3% (<0.0001)	20% (0. 288)

结果表明：SLE病人血清抗体水平与正常人血清抗体水平相比均有统计学差异，而肿瘤病人血清抗体水平与正常人血清抗体水平无统计学差异。SLE病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平相比有统计学差异，而肿瘤病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平无统计学差异。

3、试剂盒的应用价值评价

ROC曲线又称受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve)，是反映检测指标敏感性和特异性连续变量的综合指标。计算ROC曲线下面积AUC可以评价诊断效率，面积大于0.5可认为该指标有诊断意义，面积越大判断价值越高。

为评价步骤一制备的试剂盒在诊断SLE中的应用价值，根据病人组和对照组的抗体水平绘制ROC曲线，见图8。结果表明：曲线下面积AUC达到0.8633，证明本试剂盒在诊断SLE中的有一定应用价值。

实施例4、通过 α -1, 6葡聚糖特异性抗体IgG检测试剂盒辅助检测RA疾病

一、试剂盒的制备

同实施例3的步骤一。

二、试剂盒的应用

应用步骤一制备的试剂盒辅助检测RA疾病。

1、血清采集

同实施例2的步骤二的2。

2、检测

用右旋糖酐包被ELISA板，分别检测3组人群血清中的右旋糖酐特异性抗体IgG。具体方法如下：

1) 用右旋糖酐(50 $\mu\text{g/ml}$)作为抗原包被96孔酶标板，每孔100 μl ，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，PBST溶液洗5次；

2) 2% BSA 37℃封闭2 h, PBST溶液洗5次;

3) 每孔分别加入100μl用PBST-BSA溶液稀释的稀释度为1:200的30例健康人血清、稀释度为1:200的30例肿瘤病人血清、稀释度为1:200的30例RA病人血清, 37℃孵育2 h, PBST溶液洗5次;

4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgG, 37℃孵育1 h, PBST溶液洗5次; OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色, 12.5%硫酸溶液终止反应, 读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。在全部实验中健康人对照组的OD读数控制在0.2-0.3, 其它2组的吸光度读数均除以对照组读数得到结合指数(binding index), 所有显示结果均以结合指数来表示。各组人群之间抗体水平用*Student's t test*比较差别。另外, 设定健康人组平均抗体水平加3倍标准差后的读数作为判断阳性的截断值(cut-off value), 并以此计算各组阳性率。各组人群之间的阳性率用*Fisher's exact*检验比较差别。

3组人群的右旋糖酐特异性抗体IgG水平见图9。3组人群的阳性率见表4。

表4 不同人群中抗α-1, 6-葡聚糖IgG抗体阳性率比较

HS组	RA组	CA组
6.7%	60% (<0.0005)	20% (0.288)

结果表明: RA病人血清抗体水平与正常人血清抗体水平相比均有统计学差异, 而肿瘤病人血清抗体水平与正常人血清抗体水平无统计学差异。RA病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平相比有统计学差异, 而肿瘤病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平无统计学差异。

3、试剂盒的应用价值评价

ROC曲线又称受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve), 是反映检测指标敏感性和特异性连续变量的综合指标。计算ROC曲线下面积AUC可以评价诊断效率, 面积大于0.5可认为该指标有诊断意义, 面积越大判断价值越高。

为评价步骤一制备的试剂盒在诊断RA中的应用价值, 根据病人组和对照组的抗体水平绘制ROC曲线, 见图10。结果表明: 曲线下面积AUC达到0.7800, 证明本试剂盒在诊断RA中的有一定应用价值。

实施例5、通过 α -1,4葡聚糖特异性抗体IgA检测试剂盒辅助检测RA疾病

一、试剂盒的制备

试剂盒的组成如下：

黄芪多糖 (APS)：购自Pharmagenesis公司，由D-glucose组成，主链通过 α -1,4-糖甙键连接，侧链通过 α -1,6-糖甙键连接。

辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗人IgA：购自SBA公司；

牛血清白蛋白 (BSA)：购自Hyclone公司；

PBS缓冲液：PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L，pH为7.2；

PBST溶液：在上述PBS缓冲液中加入Tween 20，Tween 20和PBS缓冲液的体积比为0.05%；

PBST-BSA溶液：在上述PBST溶液中加入牛血清白蛋白 (BSA)，牛血清白蛋白的终浓度为1克/L；

OPD-磷酸柠檬酸缓冲液 (pH 9.6)：在磷酸柠檬酸缓冲液加入磷苯二胺，邻苯二胺的质量百分比浓度为0.06%；所述磷酸柠檬酸缓冲液的 pH为5.0，磷酸的浓度为0.1mol/L，柠檬酸的浓度为0.05mol/L；

硫酸；

96孔酶标板：Costar公司。

二、试剂盒的应用

1、血清采集

同实施例2的步骤二的2。

2、检测

应用步骤一制备的试剂盒辅助检测RA疾病。

用右旋糖酐包被ELISA板，分别检测3组人群血清中的右旋糖酐特异性抗体IgA。具体方法如下：

1) 用右旋糖酐 (50 μ g/ml) 作为抗原包被96孔酶标板，每孔100 μ l，4℃过夜，PBST溶液洗5次；

2) 2% BSA 37℃封闭2 h，PBST溶液洗5次；

3) 每孔分别加入100 μ l用PBST-BSA溶液稀释的稀释度为1:200的30例健康人血清、稀释度为1:200的30例肿瘤病人血清、稀释度为1:200的30例RA病人血清，37℃

孵育2 h，PBST溶液洗5次；

4) 再加入1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgA，37℃孵育1 h，PBST溶液洗5次；OPD-磷酸柠檬酸缓冲液显色，12.5%硫酸溶液终止反应，读取OD492 nm吸光度值。

每个样本设3个重复。在全部实验中健康人对照组的OD读数控制在0.2-0.3，其它2组的吸光度读数均除以对照组读数得到结合指数(binding index)，所有显示结果均以结合指数来表示。各组人群之间抗体水平用*Student's t test*比较差别。另外，设定健康人组平均抗体水平加3倍标准差后的读数作为判断阳性的截断值(cut-off value)，并以此计算各组阳性率。各组人群之间的阳性率用*Fisher's exact*检验比较差别。

3组人群的APS特异性抗体IgG水平见图11。3组人群的阳性率见表5。

表5 不同人群中抗 α -1, 6-葡聚糖IgA抗体阳性率比较

HS组	RA组	CA组
6.7%	36.7% (0.036)	16.7% (0.388)

结果表明，RA病人的 α -1, 4葡聚糖特异性抗体IgA较正常人升高($p < 0.05$)，肿瘤病人组与正常人组无差别。RA病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平相比有统计学差异，而肿瘤病人血清抗体阳性率水平与正常人血清抗体阳性率水平无统计学差异。

3、试剂盒的应用价值评价

ROC曲线又称受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve)，是反映检测指标敏感性和特异性连续变量的综合指标。计算ROC曲线下面积AUC可以评价诊断效率，面积大于0.5可认为该指标有诊断意义，面积越大判断价值越高。

为评价步骤一制备的试剂盒在诊断RA中的应用价值，根据病人组和对照组的抗体水平绘制ROC曲线，见图12。结果表明：曲线下面积AUC达到0.67，证明本试剂盒在诊断RA中的有一定应用价值。

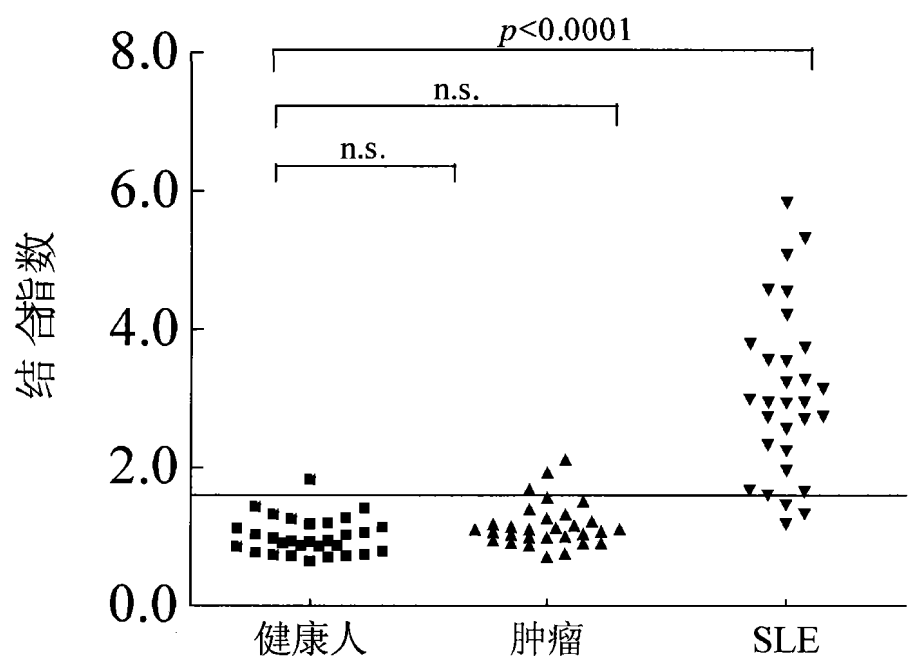


图 1

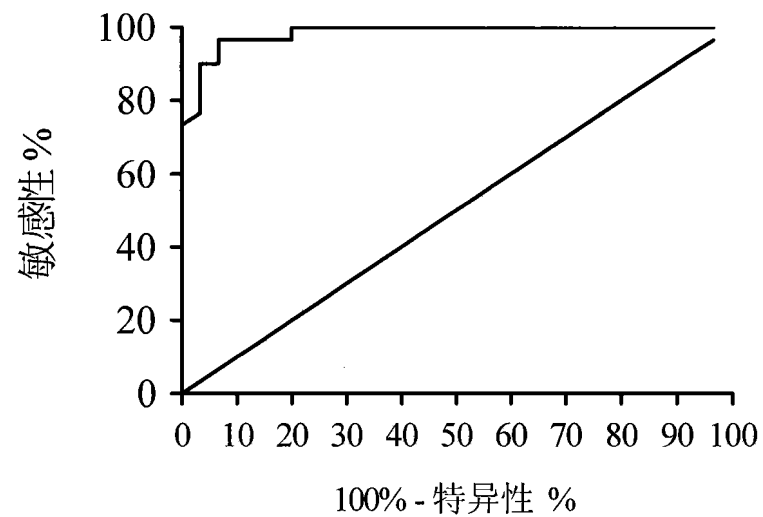


图 2

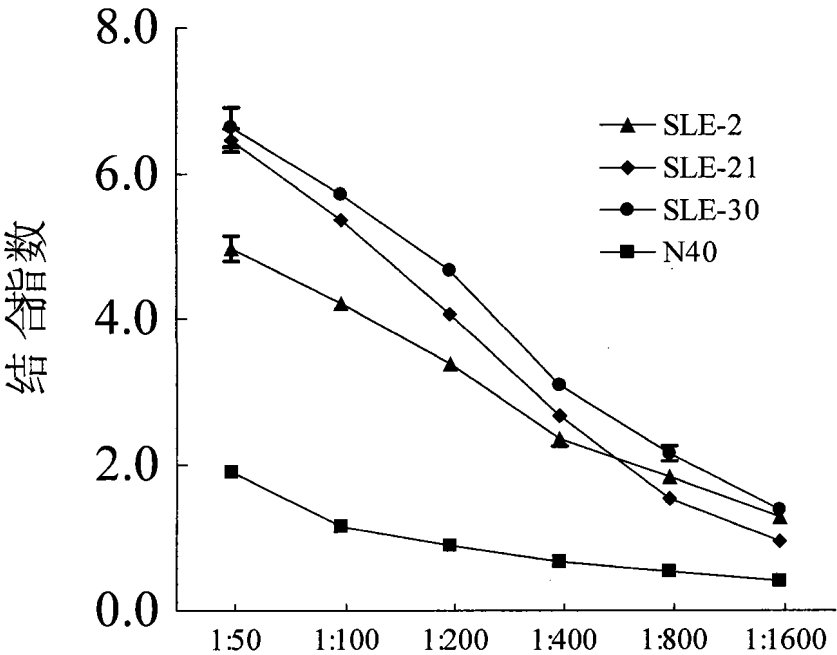


图 3

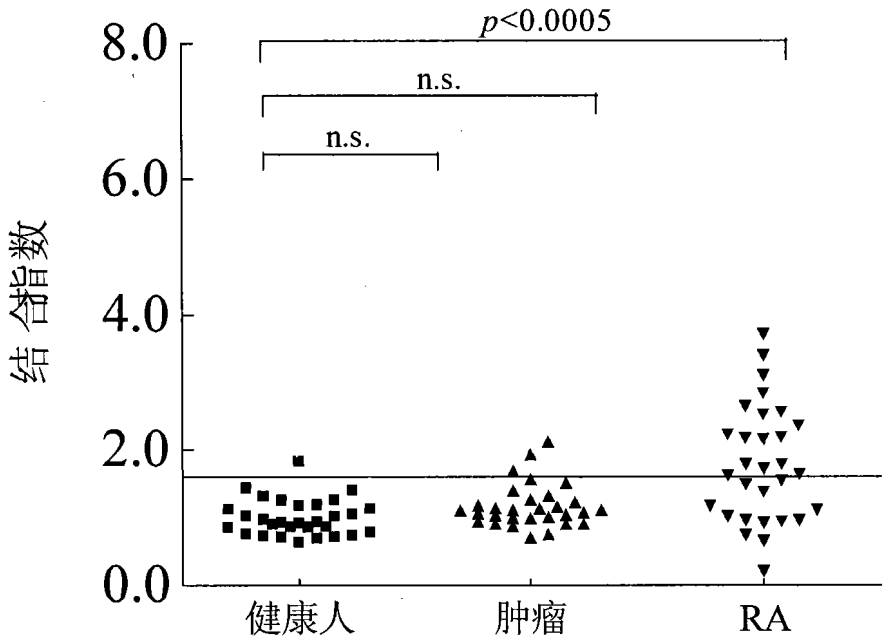


图 4

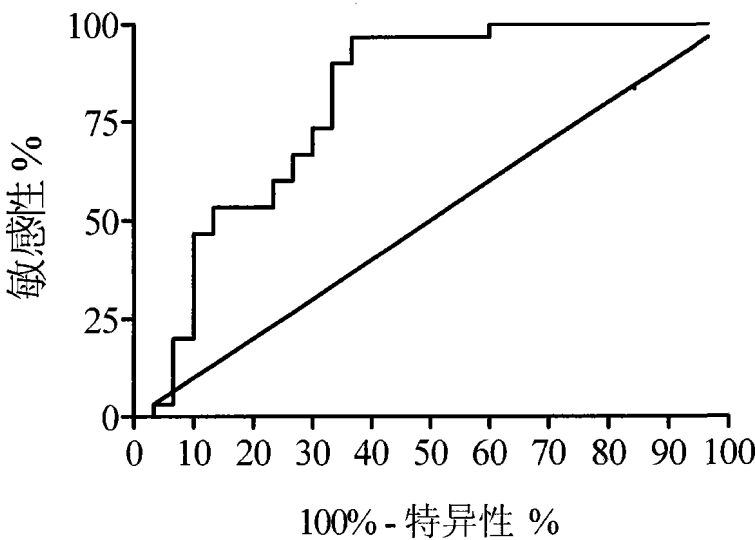


图 5

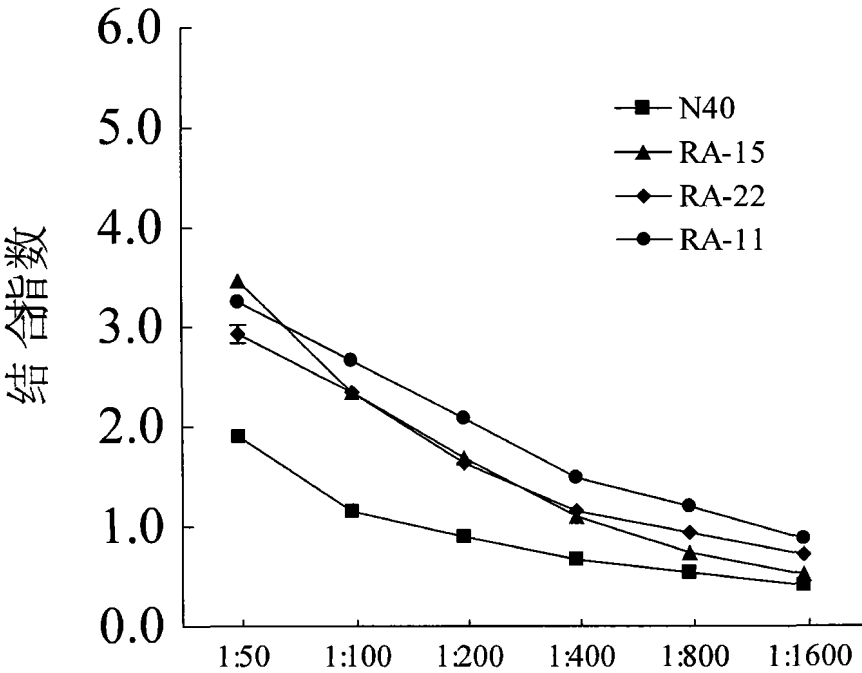


图 6

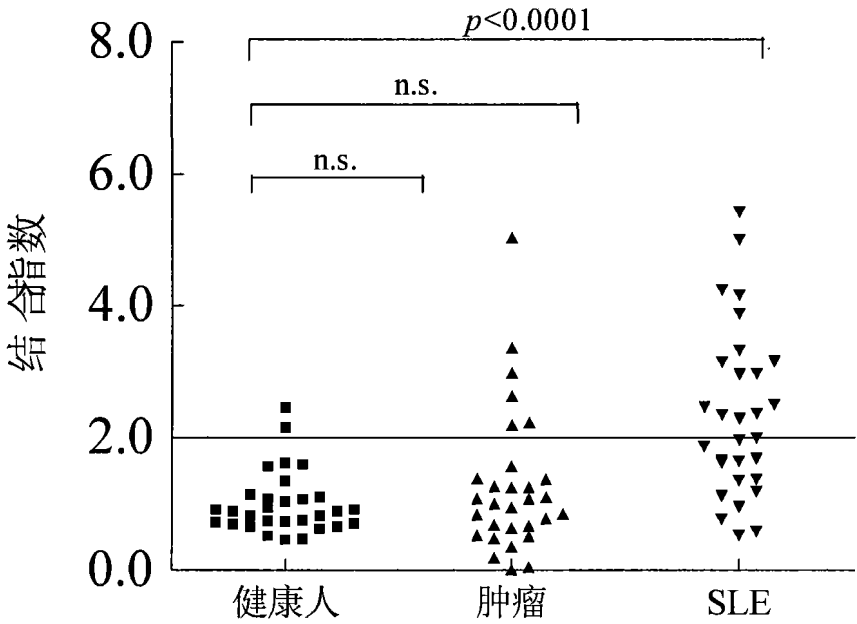


图 7

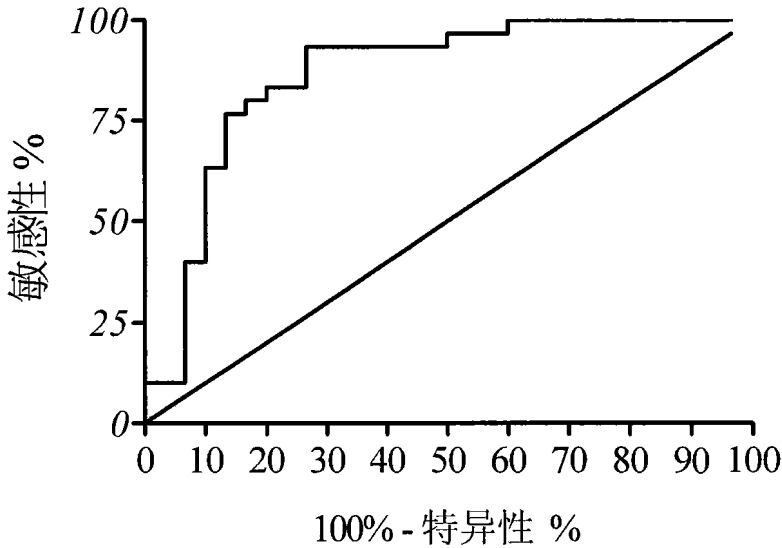


图 8

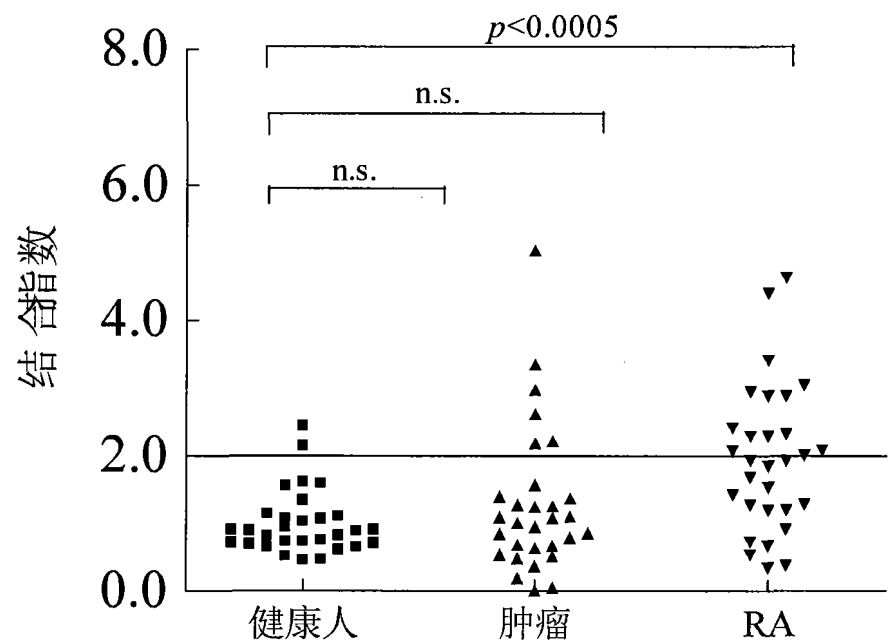


图 9

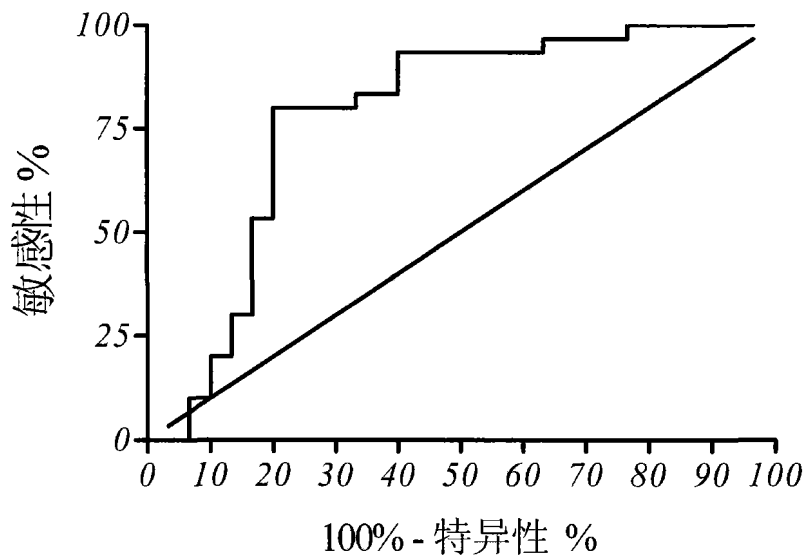


图 10

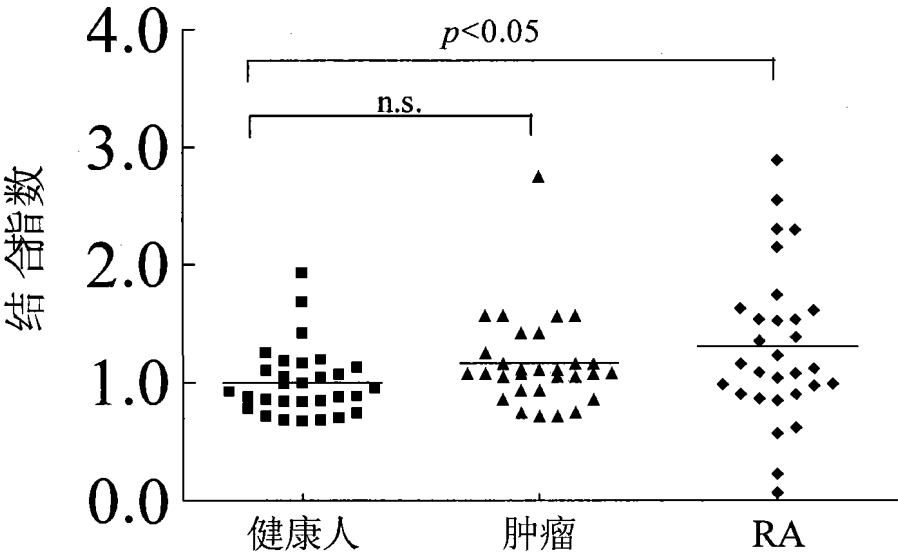


图 11

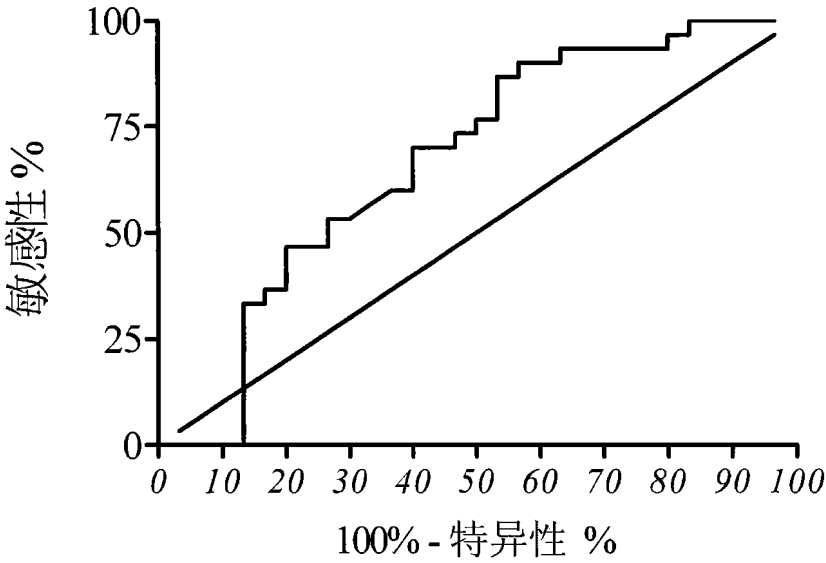


图 12

专利名称(译)	通过葡聚糖特异性抗体辅助诊断自身免疫性疾病的试剂盒		
公开(公告)号	CN101403749A	公开(公告)日	2009-04-08
申请号	CN200810226188.6	申请日	2008-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	高晓明 戴慧 董红亮 龙锴 张岩 徐晓军		
发明人	高晓明 戴慧 董红亮 龙锴 张岩 徐晓军		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101403749B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了通过葡聚糖特异性抗体辅助诊断自身免疫性疾病的试剂盒。本发明公开的辅助诊断系统性红斑狼疮的ELISA试剂盒和类风湿性关节炎的ELISA试剂盒，均包括用于包被的抗原；所述用于包被的抗原可为 α -1,4-葡聚糖，优选黄芪多糖；所述用于包被的抗原也可为 α -1,6-葡聚糖，优选右旋糖苷。本发明的试剂盒可以用于辅助诊断系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎，具有重要的应用价值。

