

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00100250.3

[43] 公开日 2001 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 1304042A

[22] 申请日 2000.1.11 [21] 申请号 00100250.3

[71] 申请人 吴光耀

地址 100091 北京市圆明园西路北京大学燕北园
303 楼 406 号

[72] 发明人 王素云

[74] 专利代理机构 北京市专利事务所

代理人 郭佩兰

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 用于检测患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

一种用于检测腹腔自身免疫病患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒及其制备方法, 试剂盒包括: (1) 载体滤膜: 其孔径: 0.22 - 1.20 μ m, (2) 标记抗原: 抗原浓度 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为 15 - 5, 标记物浓度为 0.01% - 2.00 (V/V), 标记物为 亮绿或快绿, 抗原与标记物的用量比为 1 - 10 : 10 - 1 (V/V), (3) 质控血清: 其特异蛋白总量总 Ig 为 2 - 10mg/ml。本试剂盒制备方法简便, 本滴渗法是定性纸片法, 检测快速、简单。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1、一种用于检测腹腔自身免疫病患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒，其特征在于：它包括：

（1）载体滤膜：其孔径：0.22-1.20 μ m，

（2）标记抗原：抗原浓度 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为 15 - 5，

标记物浓度为 0.01%-2.00%（V/V），标记物为亮绿或快绿，抗原与标记物的用量比为 1-10:10-1（V/V），

（3）质控血清：其特异蛋白总量总 Ig 为 2 - 10mg/ml。

2、一种制备权利要求 1 所述试剂盒的方法，其特征在于：它包括以下步骤：

（1）标记抗原：抗原浓度 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为 15 - 5，采用亮绿或快绿为标记物，其浓度为 0.01%-2.00%（V/V），抗原与标记物的用量比为 1 - 10：10 - 1 V/V），按照上述配比，逐滴混合，室温静置半小时后，于显微镜下观察有大量蓝绿色囊泡出现，表示标记完成，

（2）质控血清的制备：

取市售 SIGMA 公司 G3375 Gliadin 作为免疫青紫蓝兔的抗原，采用常规手段，免疫；抗血清中清蛋白和 γ -球蛋白的分离与制备；测定抗血清中蛋白含量的测定。

3、根据权利要求 2 所述制备试剂盒的方法，其特征在于：所述抗血清中清蛋白和 γ -球蛋白的分离与制备，采用 PAGE 法：

（1）血清处理：血清：10%甘油=1：1（V/V）

（2）电极缓冲液：Tris-Gly, pH 8.3

（3）胶浓度：浓缩胶 5%，分离胶 12%

（4）电泳条件：温度 15-20 $^{\circ}$ C，恒流 20mA，电泳 4-5 小时

（5）分离提取 γ -球蛋白：采用横向切胶法。连续切胶，每条胶长 2mm；并分别立即浸泡于 0.9%的生理盐水中，4 $^{\circ}$ C 提取 48 小时。

（6）电泳条带扫描：在分离提取 γ -球蛋白的同时，进行纵向切胶并对蛋白条带染色及脱色，然后作条带扫描；

抗血清中蛋白含量的测定

（1）在紫外区波长 280nm 下测定抗血清的总蛋白含量。

（2）根据免疫活性测定的结果和电泳条带扫描图谱确定电泳条带中 γ -球蛋白的位置，计算 γ -球蛋白的含量，本实验控制特异蛋白总量，总 Ig 为 2 - 10mg/ml。

说明书

一种用于检测腹腔自身免疫病患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒及其制备方法

本发明涉及一种用于检测腹腔自身免疫病患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒及其制备方法。

在测试方法上，用于快速诊断的滴金法 (dot immunogold filtration assay DIGFA) 已广泛应用于人类免疫缺陷病 (HIV)，抗乙型肝炎病毒核心抗原的抗体，C-反应蛋白，早早孕及感染的诊断等疾病的检测。在上述系列临床测试中全部用胶体金为标记物进行目视观察。无论以胶体金标记抗原还是标记抗体都存在一个成本价格昂贵的特点。

步入90年代，随着HIV疾病在世界范围内出现不同程度的蔓延，引起了世界卫生组织及各国的卫生部门及医疗机构对该病的防治进行了大量全方位的研究，并发现由于HIV病毒对患者免疫功能的损坏，在受到HIV病毒感染的人中，当T-细胞再次受到外源蛋白刺激时，许多T-细胞甚至包括没有受到感染的T-细胞都不是按正常方式发生细胞分裂，而是发生细胞自杀，即出现由遗传控制的功能所发生的称为程序性细胞自杀，故此，该技术可能对于爱滋病患者病情的发展及跟踪治疗提供一丝帮助。同时该技术对于研究和检测疱疹性皮肤病患者 Gliadin 受体是个极为有利的工具。

本发明的目的是提供一种检测腹腔自身免疫病患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒及其制备方法，该试剂盒容易制备，利用该试剂盒可以快速检测。

为达到上述目的，本发明采用以下技术方案：这种用于检测腹腔自身免疫病患者血清中 Gliadin 抗体的试剂盒包括：

(1) 载体滤膜：其孔径：0.22-1.20 μ m，

(2) 标记抗原：抗原浓度 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为 15 - 5，

标记物浓度为 0.01%-2.00% (V/V)，标记物为亮绿或快绿，抗原与标记物的用量比为 1-10:10-1 (V/V)，

(3) 质控血清：其特异蛋白总量总 Ig 为 2 - 10mg/ml。

本发明的方法包括以下步骤：

(1) 标记抗原：抗原浓度 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为 15 - 5，采用亮绿或快绿为标记物，其浓度为 0.01%-2.00% (V/V)，抗原与标记物的用量比为 1 - 10 : 10 - 1 (V/V)，按照上述配比，逐滴混合，室温静置半小时后，于显微镜下观察有大量蓝绿色囊泡出现，表示标记完成，

（2）质控血清的制备：

取市售SIGMA公司G3375 Gliadin作为免疫青紫蓝兔的抗原，采用常规手段，免疫；抗血清中清蛋白和 γ -球蛋白的分离与制备；测定抗血清中蛋白含量的测定。

在本发明专利中利用了抗原可呈现的特殊形态特征即可以在特定条件下抗原能够以出现囊泡形态的特征，并能利用该特征包裹可做为标记物的染料的技术进行抗原标记，亮绿，快绿就是本方法中标记抗原的染料。用该标记抗原在载体滤膜上对人血清和免疫兔血清中抗Gliadin抗体进行定性测定获得了与酶联免疫吸附实验中的有类同的定性数据。故用绿色染料标记抗原进行滴渗并用于临床快速诊断的技术是个创新。

以下结合实施例对本发明作进一步说明：

实施例1.

质控血清的制备：

1、免疫：取市售 SIGMA 公司 G3375 Gliadin 作为免疫青紫蓝兔的抗原，采用常规手段，分四次进行免疫。整个免疫过程在无菌条件下进行。在免疫前首先将抗原配制成 1mg/ml 的溶液备用。

第一次免疫：取抗原 3ml，逐滴加入等体积的完全佐剂，在加佐剂过程中不断研磨，使成乳浊液，分次注入消毒后的兔脚垫中，每只脚垫 0.4-4.5ml。

第二次免疫：抗原乳浊液的制备方法同上，只不过采用不完全佐剂（即不含卡介苗），制备体积亦为 6ml，兔免疫部位为背部皮下多点注射，每点 0.4-0.5ml。

第三次免疫：完全同第二次免疫。

第四次免疫：取无菌的抗原溶液 1ml，慢速注入兔耳缘静脉中，每只耳朵注射量为 0.5—0.7ml。每次免疫的间隔均为 5-7 天，经过近一月的免疫后，从兔的耳部取少量血进行效价测定。

2、抗血清中清蛋白和 γ -球蛋白的分离与制备——PAGE 法

（1）血清处理：血清：10%甘油=1：1（v/v）

（2）电极缓冲液：Tris-Gly, pH 8.3

（3）胶浓度：浓缩胶 5%，分离胶 12%

（4）电泳条件：温度 15-20°C，恒流 20mA，电泳 4-5 小时

（5）分离提取 γ -球蛋白：采用横向切胶法。连续切胶，每条胶长 2mm；并分别立即浸泡于 0.9%的生理盐水中，4°C 提取 48 小时。

（6）电泳条带扫描：在分离提取 γ -球蛋白的同时，进行纵向切胶并对蛋白条带染色及脱色，然后作条带扫描，以确定活性部位的位置。

3、 抗血清中蛋白含量的测定

〈1〉在紫外区波长 280nm 下测定抗血清的总蛋白含量。

〈2〉根据免疫活性测定的结果和电泳条带扫描图谱确定电泳条带中 γ -球蛋白的位置，计算 γ -球蛋白的含量。本质控血清的特异蛋白总量，总 Ig 为 2 - 10mg/ml。

上述免疫活性测定采用酶联免疫吸附法

〈1〉抗原包被量：10 -50 μ g/孔

〈2〉第一抗体为系列稀释的抗血清

〈3〉第二抗体为羊抗兔酶标抗体

〈4〉底物：TMB

〈5〉反应产物测定波长：450nm

Ig类型的检测。

采用直接法，通过酶联免疫吸附实验即将正常人或病人血清直接铺板，再用酶标羊抗人IgG或羊抗人IgA及酶的底物按常规比例进行检测。

本实施例用是的酶标抗体为辣根酶标记，底物为TMB，酶促反应产物检测使用酶标仪，波长为450nm。

抗原的标记：

免疫用的抗原制成 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为15-5的浓度与0.01%-2.00% (V/V) 的亮绿按1-10: 10-1的比例逐滴混合，室温静置半小时后，于显微镜下观察有大量的蓝绿色囊泡出现，便意味着完成制备标记抗原。

滴绿法检测人血清抗 Gliadin IgG 抗体；

首先滴 15 μ l 病人血清在给定的滤膜上，再滴上 15 μ l 试剂盒中标记抗原，(本测定中，标记抗原的抗原浓度为 $E_{1cm}^{1\%280nm}$ 为 10，亮绿浓度 0.1 (V/V)，两者比例为 1:1,本实用新型采用的磷酸缓冲液为 0.01mol/L,pH 为 7.6) 反应完毕 (待液体完全渗入膜后)，立即观察到滤膜上标记抗原的外围沉淀圈与内部 (兰绿色实心或杂斑) 之间有空白间隔,其中空白间隔极明显者定为阳性，空白间隔仅可分辨者定为 $\pm$ ，不可分辨者定为阴性 (见图 1)，

表1系滤膜片法 (本发明) 与酶联免疫法结果对照比较

测试样品	测试结果	方法	酶联免疫法 $O.D_{450nm}$	滤膜片法**
正常血清 (N) *			0.37	有可辨白环 $\pm$
稀释100倍正常人血清 (N_{100})			0.12	无白环 -
稀释20倍免疫兔血清 (IR_{20})			1.11	有明显白环 +

(N) *: 用14人正常人血清测试结果

****:**滤膜法见图1

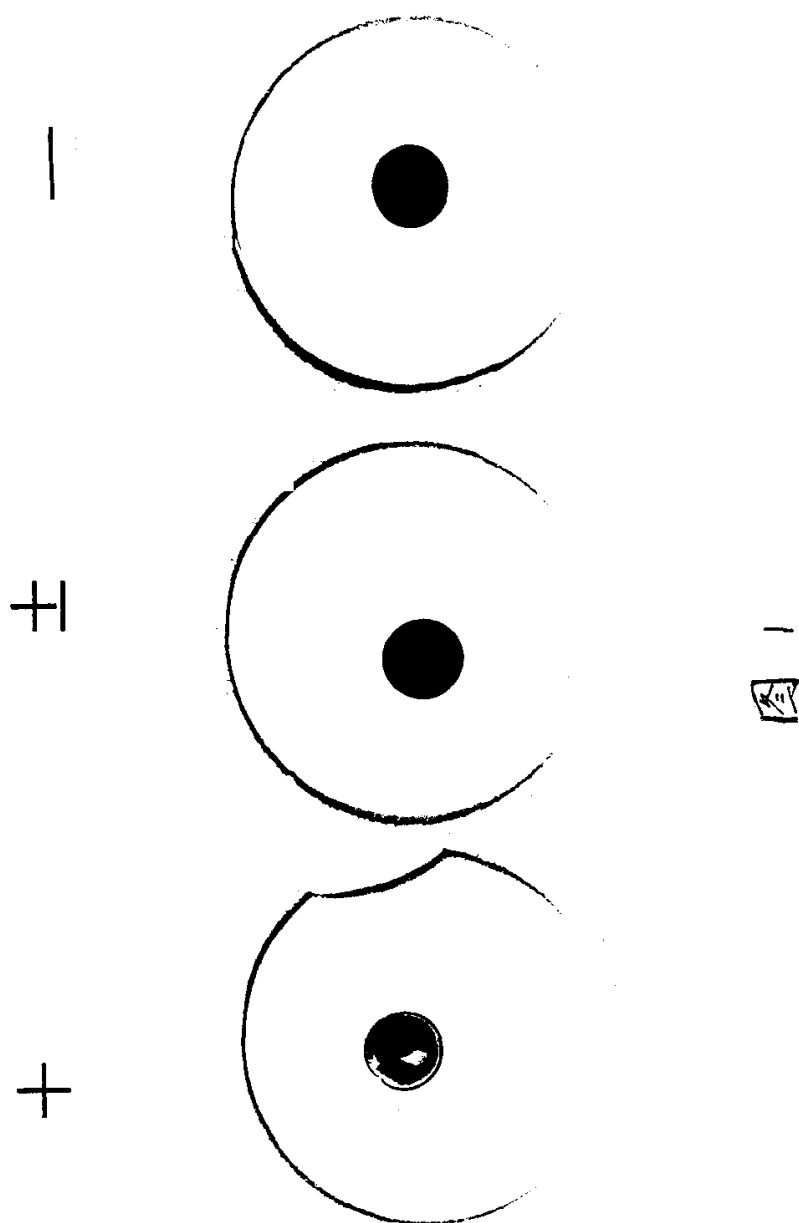
图1中，左图为阳性，在兰绿色斑外有白环，中图为±性，在兰绿色斑外有不明显的白环；右图为阴性，在兰绿色斑无白环。

检测范围： 血清总蛋白 $47 \times 10^3 \text{ mg/L}$ --- $58 \times 10^3 \text{ mg/L}$

血清球蛋白 $<1.4 \times 10^3 \text{ mg/L}$ --- $>2.0 \times 10^3 \text{ mg/L}$

本发明优点：本发明提供的试剂盒制作简便，测定快速。

说明书附图



专利名称(译)	用于检测患者血清中Gliadin抗体的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN1304042A	公开(公告)日	2001-07-18
申请号	CN00100250.3	申请日	2000-01-11
申请(专利权)人(译)	吴光耀		
当前申请(专利权)人(译)	吴光耀		
[标]发明人	王素云		
发明人	王素云		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测腹腔自身免疫病患者血清中Gliadin抗体的试剂盒及其制备方法,试剂盒包括:(1)载体滤膜:其孔径:0.22 - 1.20um,(2)标记抗原:抗原浓度E1cm1%280nm为15 - 5,标记物浓度为0.01% - 2.00(V/V),标记物为亮绿或快绿,抗原与标记物的用量比为1 - 10:10 - 1(V/V),(3)质控血清:其特异蛋白总量总Ig为2 - 10mg/ml。本试剂盒制备方法简便,本滴渗法是定性纸片法,检测快速、简单。

