



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102230935 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 02

(21) 申请号 201110091669. 2

(22) 申请日 2011. 04. 13

(71) 申请人 苏州博赛生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
328 号 4 栋

申请人 苏州大学

(72) 发明人 何杨 朱明清 赵贇霄 吴庆宇

阮长耿

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

高通量荧光单抗纳米微球试剂盒

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种能快速、简便、准确地检测血小板自身抗体,从而对自身免疫性疾病作出早期诊断的高通量荧光单抗纳米微球试剂盒,包括 a、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体 SZ-1 的荧光纳米微球 1 溶液 ;b、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体 SZ-2 的荧光纳米微球 2 溶液 ;c、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-21 的荧光纳米微球 3 溶液 ;d、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-22 的荧光纳米微球 4 溶液 ;e、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-51 的荧光纳米微球 5 溶液 ;f、异硫氰酸荧光素连接的羊抗人多克隆抗体 ;g、PBS 液。本发明还提供了该试剂盒的应用及其主要成分的制备方法。

1. 高通量荧光单抗纳米微球试剂盒,其特征在于多级荧光素连接多种单抗-纳米微球的试剂盒组成为:

a、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体 SZ-1(抗人血小板膜糖蛋白 IX 单克隆抗体)的荧光纳米微球 1 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-1 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 1 浓度为 1×10^6 个/ml;

b、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体 SZ-2(抗人血小板膜糖蛋白 Ib 单克隆抗体)的荧光纳米微球 2 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-2 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 2 浓度为 1×10^6 个/ml;

c、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-21(抗人血小板膜糖蛋白 IIIa 单克隆抗体)的荧光纳米微球 3 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-21 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 3 浓度为 1×10^6 个/ml;

d、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-22(抗人血小板膜糖蛋白 IIb 单克隆抗体)的荧光纳米微球 4 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-22 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 4 浓度为 1×10^6 个/ml;

e、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-51(抗人血小板 P 选择素单克隆抗体)的荧光纳米微球 5 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-51 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 5 浓度为 1×10^6 个/ml;

f、异硫氰酸荧光素 (FITC) 连接的羊抗人多克隆抗体,浓度为 $15 \mu\text{g/ml}$;

g、PBS 液 ($\text{NaCl} 0.15\text{mol/L}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 0.01\text{mol/L}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 0.01\text{mol/L}$ 的混合溶液, $\text{pH} 7.4$);

其中荧光纳米微球 1~荧光纳米微球 5 为 SPHEROTECH 公司产品中选取的五个不同荧光梯度的纳米微球。

2. 根据权利要求 1 所述高通量荧光单抗纳米微球试剂盒用于检测血小板特异性自身抗体的方法,其特征在于所述检测血小板特异性自身抗体的方法包括如下步骤:

步骤一、取血小板裂解液待检标本 $50 \mu\text{l}$,加入高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 a、b、c、d、e,室温震荡孵育 2 小时;

步骤二、将步骤一孵育后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 洗涤,离心,弃上清液,加入高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 f $100 \mu\text{l}$,室温震荡孵育 30 分钟;

步骤三、将步骤二孵育后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 洗涤,然后高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g $500 \mu\text{l}$ 重悬;

步骤四、将步骤三重悬后的溶液在流式细胞仪上检测,计数 $1500 \sim 2000$ 个微球,测出不同荧光梯度纳米微球的 FITC 平均荧光强度值 (MFI)。

步骤五、结果判断:采集健康人血小板裂解液作为对照标本重复以上步骤一、步骤二、步骤三、步骤四,测定不同荧光梯度纳米微球的 FITC 平均荧光强度值 (MFI),计算出正常人不同单克隆抗体 MFI 上限,将待检标本测出的 MFI 值与正常人 MFI 上限进行比对,待检标本 MFI 值中高于正常人 MFI 上限判为阳性。

3. 根据权利要求 1 所述高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的主要成分的制备方法,其特征在于所述制备方法包括如下步骤:

步骤A、用碳酸盐缓冲液分别稀释好单克隆抗体 SZ1, SZ2, SZ21, SZ22, SZ51 各约 16 μ g, 分别加入 SPHEROTECH 公司生产的不同荧光梯度的荧光纳米微球 1、荧光纳米微球 2、荧光纳米微球 3、荧光纳米微球 4、荧光纳米微球 5, 在摇床上混匀, 4°C 过夜;

步骤B、将步骤A过夜后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 加适量吐温洗涤 3 次, 再加入 2% 小牛血清白蛋白, 在摇床上混匀, 反应 2 小时;

步骤C、将步骤B反应后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 加适量吐温洗涤 3 次, 再加入含 0.02% 叠氮钠的等渗盐溶液重悬, 按剂量分装得到高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 a、b、c、d、e, 4°C 保存。

高通量荧光单抗纳米微球试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及诊断试剂盒领域,具体是高通量荧光单抗纳米微球试剂盒。

背景技术

[0002] 特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一种免疫介导的血小板减少综合征。是临床最常见的出血性疾病,约占出血性疾病总数的 30%。一般认为,该病是由自身抗体致敏的血小板被单核巨噬细胞系统过度破坏所致。其特点是自发性出血,血小板减少,出血时间延长和血块收缩不良,骨髓中巨核细胞的发育受到抑制,临床以皮肤粘膜或内脏出血为主要表现,严重者可有其它部位出血如鼻出血、牙龈渗血、妇女月经量过多或严重吐血、咯血、便血、尿血等症状,并发颅内出血是本病的致死病因。临床可分为急性型和慢性型,前者多见于儿童,后者好发于 40 岁以下的女性。

[0003] 血小板自身抗体主要为抗血小板膜糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 为主要的自身抗体,其次为抗 GP Ib 自身抗体,少数表现为抗 GP Ia/IIa、GPIV 自身抗体。因此,对血小板特异性自身抗体的检测是免疫介导的血小板减少综合征的诊断依据。目前国内外检测血小板特异性自身抗体的方法主要有单克隆抗体特异性血小板抗原固定术 (MAIPA)、抗原捕获酶联免疫吸附试验 (MACE) 和流式细胞术 (FCM)。MAIPA 和 MACE 方法由于操作复杂、用血量、灵敏度低等技术上的限制而极少应用于临床诊断。FCM 分析血小板膜糖蛋白特异性自身抗体的方法尚不成熟。1995 年, Koksich 等利用流式细胞术荧光共振能量转移的方法,测定抗血小板膜糖蛋白特定位点的自身抗体,然而该方法步骤繁琐,难以标准化,无法作为诊断 ITP 的常规检查。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种能快速、简便、准确地检测血小板自身抗体,从而对自身免疫性疾病作出早期诊断的高通量荧光单抗纳米微球试剂盒。本发明还提供了该试剂盒的应用及其主要成分的制备方法。

[0005] 本发明高通量荧光单抗纳米微球试剂盒组成为:

[0006] a、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体 SZ-1 (抗人血小板膜糖蛋白 IX 单克隆抗体) 的荧光纳米微球 1 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-1 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$, 荧光纳米微球 1 浓度为 1×10^6 个 /ml ;

[0007] b、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体 SZ-2 (抗人血小板膜糖蛋白 Ib 单克隆抗体) 的荧光纳米微球 2 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-2 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$, 荧光纳米微球 2 浓度为 1×10^6 个 /ml ;

[0008] c、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-21 (抗人血小板膜糖蛋白 IIIa 单克隆抗体) 的荧光纳米微球 3 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-21 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$, 荧光纳米微球 3 浓度为 1×10^6 个 /ml ;

[0009] d、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-22 (抗人血小板膜糖蛋白 IIb 单克

隆抗体)的荧光纳米微球 4 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-22 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 4 浓度为 1×10^6 个 /ml ;

[0010] e、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体 SZ-51 (抗人血小板 P 选择素单克隆抗体)的荧光纳米微球 5 溶液,溶剂为 PBS,单克隆抗体 SZ-51 的浓度为 $16 \mu\text{g/ml}$,荧光纳米微球 5 浓度为 1×10^6 个 /ml ;

[0011] f、异硫氰酸荧光素 (FITC) 连接的羊抗人多克隆抗体,浓度为 $15 \mu\text{g/ml}$;

[0012] g、PBS 液 ($\text{NaCl}0.15\text{mol/L}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_40.01\text{mol/L}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_40.01\text{mol/L}$ 的混合溶液, pH7.4) ;

[0013] 其中荧光纳米微球 1、荧光纳米微球 2、荧光纳米微球 3、荧光纳米微球 4、荧光纳米微球 5 为 SPHEROTECH 公司产品中选取的五个不同荧光梯度的纳米微球。

[0014] 上述高通量荧光单抗纳米微球试剂盒用于检测血小板特异性自身抗体的方法,包括如下步骤 :

[0015] 步骤一、取血小板裂解液待检标本 $50 \mu\text{l}$,加入高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 a、b、c、d、e,室温震荡孵育 2 小时 ;

[0016] 步骤二、将步骤一孵育后的溶液用试剂盒中的成分 g 洗涤,离心,弃上清液,加入高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 f $100 \mu\text{l}$,室温震荡孵育 30 分钟 ;

[0017] 步骤三、将步骤二孵育后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 洗涤,然后用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g $500 \mu\text{l}$ 重悬 ;

[0018] 步骤四、将步骤三重悬后的溶液在流式细胞仪上检测,计数 $1500 \sim 2000$ 个微球,测出不同荧光梯度纳米微球的 FITC 平均荧光强度值 (MFI)。

[0019] 步骤五、结果判断 :采集足够多的健康人血小板裂解液作为对照标本重复以上步骤一、步骤二、步骤三、步骤四,测定不同荧光梯度纳米微球的 FITC 平均荧光强度值 (MFI),计算出正常人不同单克隆抗体 MFI 上限,将待检标本测出的 MFI 值与正常人 MFI 上限进行比对,待检标本 MFI 值中高于正常人 MFI 上限判为阳性。

[0020] 上述高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 a、b、c、d、e 的制备方法,其特征在于包括如下步骤 :

[0021] 步骤 A、用碳酸盐缓冲液分别稀释好单克隆抗体 SZ1, SZ2, SZ21, SZ22, SZ51 各约 $16 \mu\text{g}$,分别加入 SPHEROTECH 公司生产的不同荧光梯度的荧光纳米微球 1、荧光纳米微球 2、荧光纳米微球 3、荧光纳米微球 4、荧光纳米微球 5,在摇床上混匀, 4°C 过夜 ;

[0022] 步骤 B、将步骤 A 过夜后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 加适量吐温洗涤 3 次,再加入 2% 小牛血清白蛋白,在摇床上混匀,反应 2 小时 ;

[0023] 步骤 C、将步骤 B 反应后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 g 加适量吐温洗涤 3 次,再加入含 0.02% 叠氮钠的等渗盐溶液重悬,按剂量分装得到高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分 a、b、c、d、e, 4°C 保存。

具体实施方式

[0024] 本发明提供了高通量荧光单抗纳米微球试剂盒,同时提供了高通量荧光单抗纳米微球试剂盒用于检测血小板特异性自身抗体的方法,另外还提供了高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的主要成分的制备方法,下面通过具体实施例对本发明做进一步说明。

- [0025] 首先通过如下步骤制备高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的主要成分：
- [0026] 步骤A、配制PBS液(NaCl 0.15mol/L、 Na_2HPO_4 0.01mol/L和 NaH_2PO_4 0.01mol/L的混合溶液, pH7.4), 作为高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分g；
- [0027] 步骤B、用碳酸盐缓冲液分别稀释好单克隆抗体SZ1, SZ2, SZ21, SZ22, SZ51各约16 μg , 分别加入SPHEROTECH公司生产的不同荧光梯度的荧光纳米微球1、荧光纳米微球2、荧光纳米微球3、荧光纳米微球4、荧光纳米微球5在摇床上混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜；
- [0028] 步骤C、将步骤B过夜后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分g加适量吐温洗涤3次, 再加入2%小牛血清白蛋白, 在摇床上混匀, 反应2小时；
- [0029] 步骤D、将步骤C反应后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分g加适量吐温洗涤3次, 再加入含0.02%叠氮钠的等渗盐溶液重悬, 按剂量分装得到高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分a、b、c、d、e, 4 $^\circ\text{C}$ 保存；
- [0030] 步骤E、配制异硫氰酸荧光素(FITC)连接的羊抗人多克隆抗体, 浓度为15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 作为高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分f；
- [0031] 再按下述方法制备用于检测血小板特异性自身抗体的血小板裂解液标本：用EDTA抗凝的硅化管采集患者外周静脉血2ml作待检标本, 采集健康人外周静脉血2ml作对照标本, 分别将待检标本与对照标本进行如下操作：800rpm离心10分钟, 取上层富血小板血浆, 3000rpm离心10分钟, 分离血浆, -20 $^\circ\text{C}$ 保存(用做MAIPA), 取血小板沉淀, 用0.05% EDTA-PBS洗涤血小板3遍, 计数血小板, 调整血小板浓度到 1×10^7 个/ml, 吸取400 μl , 3000rpm离心5分钟, 弃上清液, 加入240 μl 浓度为0.5%的TritonX-100, 室温下反应20分钟, 3000rpm离心5分钟, 分别吸取上清液即得血小板裂解液标本；
- [0032] 分别将待检标本与对照标本按高通量荧光单抗纳米微球试剂盒用于检测血小板特异性自身抗体的方法, 进行如下操作：
- [0033] 步骤一、取血小板裂解液待检标本50 μl , 加入高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分a、b、c、d、e, 室温震荡孵育2小时；
- [0034] 步骤二、将步骤一孵育后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分g洗涤, 离心, 弃上清液, 加入高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分f 100 μl , 室温震荡孵育30分钟；
- [0035] 步骤三、将步骤二孵育后的溶液用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分g洗涤, 然后用高通量荧光单抗纳米微球试剂盒中的成分g 500 μl 重悬；
- [0036] 步骤四、将步骤三重悬后的溶液在流式细胞仪上检测, 计数1500~2000个微球, 测出不同荧光梯度纳米微球的FITC平均荧光强度值(MFI)。
- [0037] 步骤五、结果判断：采集足够多的健康人血小板裂解液作为对照标本重复以上步骤一、步骤二、步骤三、步骤四, 测定不同荧光梯度纳米微球的FITC平均荧光强度值(MFI), 计算出正常人不同单克隆抗体MFI上限, 将待检标本测出的MFI值与正常人MFI上限进行比对, 待检标本MFI值中高于正常人MFI上限判为阳性。
- [0038] 经过试验, 健康人血小板裂解液对应不同单克隆抗体的MFI上限如下：
- [0039] SZ1为0.856, SZ2为0.63, SZ21为0.529, SZ22为0.461, SZ51为0.462。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 高通量荧光单抗纳米微球试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN102230935A | 公开(公告)日 | 2011-11-02 |
| 申请号 | CN201110091669.2 | 申请日 | 2011-04-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 苏州大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 苏州大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 苏州大学 | | |
| [标]发明人 | 何杨 朱明清 赵赟霄 吴庆宇 阮长耿 | | |
| 发明人 | 何杨 朱明清 赵赟霄 吴庆宇 阮长耿 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/533 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明的目的是提供一种能快速、简便、准确地检测血小板自身抗体，从而对自身免疫性疾病作出早期诊断的高通量荧光单抗纳米微球试剂盒，包括a、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体SZ-1的荧光纳米微球1溶液；b、以牛血清白蛋白封闭连有单克隆抗体SZ-2的荧光纳米微球2溶液；c、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体SZ-21的荧光纳米微球3溶液；d、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体SZ-22的荧光纳米微球4溶液；e、以牛血清白蛋白封闭的连有单克隆抗体SZ-51的荧光纳米微球5溶液；f、异硫氰酸荧光素连接的羊抗人多克隆抗体；g、PBS液。本发明还提供了该试剂盒的应用及其主要成分的制备方法。