



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725156 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201811592274.9

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 陶生策 吴凡林 祁环 李华  
赖丹昀 胡传圣 赵小东 沈南  
唐元家 郭强 丁慧华

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 庄文莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

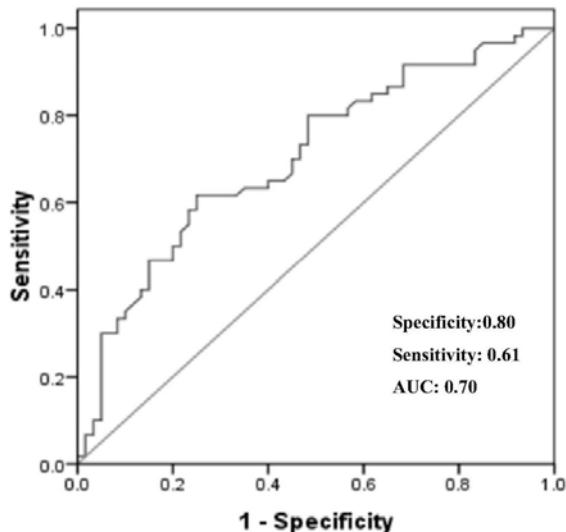
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

多肽SLE2018-V002在诊断系统性红斑狼疮试剂盒中的应用

(57)摘要

本发明公开一种多肽SLE2018-V002在诊断系统性红斑狼疮试剂盒中的应用。所述SLE2018-V002的氨基酸序列为:TIGVVRDVATQL。本发明采用临床广泛使用的酶联免疫吸附检测(ELISA)技术,应用间接法定性检测人血清中抗TIGVVRDVATQL多肽的IgG抗体的水平。通过本发明所提供的试剂盒,将作为辅助系统性红斑狼疮早期诊断的一种手段,可大大提高系统性红斑狼疮早期诊断的特异性和灵敏度,其特异性为61%、灵敏度为80%。



1. 一种多肽SLE2018-V002,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列为:TIGVVRDVATQL。
2. 一种根据权利要求1所示的多肽SLE2018-V002在制备诊断系统性红斑狼疮的组合物中的应用。
3. 根据权利要求1或2所述的多肽SLE2018-V002是从M13噬菌体随机多肽库中淘选而得到。
4. 一种诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,其特征在于,包括权利要求1所述的多肽SLE2018-V002。
5. 根据权利要求4所述的诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括标准品、包被缓冲液、封闭液、样品稀释液、终止液、酶标试剂、酶底物溶液和洗涤液。
6. 根据权利要求5所述的诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,其特征在于,所述标准品包括抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的浓度为0U/mL的标准血清1和抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的浓度为100U/mL的标准血清2;所述标准血清1为正常人血清,标准血清2为SLE2018-V002抗体为阳性的血清;  
所述多肽SLE2018-V002抗原采用包被缓冲液稀释,所述包被缓冲液为0.05±0.005M、pH 9.6±0.05的碳酸盐缓冲液;
- 所述封闭液为含0.5%牛血清白蛋白的0.01±0.005M、pH 7.4±0.05的磷酸盐-NaCl缓冲液。
7. 根据权利要求5所述的诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,其特征在于,所述酶底物溶液包括:显色剂A:500mL溶液中含醋酸钠13.6g,柠檬酸1.6g,30%双氧水0.3mL;显色剂B:500mL溶液中含TMB 350mg,DMSO 20mL,柠檬酸·H<sub>2</sub>O 5.1g。
8. 根据权利要求5所述的诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,其特征在于,所述标准品采用样品稀释液进行稀释,所述样品稀释液为0.01±0.005M pH 7.4磷酸盐-NaCl缓冲液;  
所述洗涤液为含0.05%Tween-20的、0.01±0.005M、pH 7.4±0.05磷酸盐-NaCl缓冲液;
- 所述终止液为2±0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液;
- 所述酶标试剂为含有辣根过氧化物酶标记的anti-Human IgG抗体的酶标试剂。
9. 根据权利要求5所述的诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中采用的各试剂还包含防腐剂。
10. 一种定性检测人血清中抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - A、将多肽SLE2018-V002通过SMCC与BSA偶联;
  - B、将偶联后的多肽通过包被缓冲液稀释然后包被在酶标板上的微孔内制成固相抗原,加入封闭液;
  - C、将标准品与待测血清样品用样品稀释液稀释后加入各自的抗原测定孔中,温育后,每孔加入含有辣根过氧化物酶标记的anti-Human IgG抗体的酶标试剂,形成SLE2018-V002-抗体-酶标二抗复合物;
  - D、经步骤C处理后,彻底洗涤,加酶底物溶液显色,然后加入终止液终止反应,通过OD<sub>450</sub>值即得样品中抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的水平。

## 多肽SLE2018-V002在诊断系统性红斑狼疮试剂盒中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种多肽在制备诊断和/或辅助诊断系统性红斑 狼疮疾病的试剂中的用途,尤其涉及一种多肽SLE2018-V002在诊断系统性红斑狼疮试 剂盒中的应用。

### 背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种临床表现为多系统损 害的自身免疫介导的自身免疫性疾病 (autoimmune diseases, ADs) , 常引起多器官系统的不可逆损害,严重影响患者的寿命和生活质量。系统性红斑狼疮疾病的发生率在 0.02%~0.07% 范围内,城市人群的发病率更高,患者年龄主要分布在15~45岁,且女性患者居多,男女发病比例约为1:9 (Lupus 2006.15 (5) :308-318.)。对系统性红斑狼疮 的流行率、病理机制和其生物标志物的研究是系统性红斑狼疮研究的三个重要方面。系 统性红斑狼疮的临床表现具有多样性,血清学和免疫学指标变异性很大。该自身免疫疾 病涉及多器官,包括皮肤、肾脏、脑,除了这些器官外往往伴有关节的损伤,因此免疫 反应是全身性的。引起自身免疫应答的自身组织成分被称为自身抗原,包括隐藏的自身 抗原(在胚胎期从未与自身淋巴细胞接触过,机体不能识别为自身物质) 和修饰的自身 抗原(在感染、药物、烧伤、电离辐射等因素影响下,自身组织的构象发生改变,成为 自身抗原)。机体产生自身抗原时,由于将其识别为异己部分,产生对应的自身抗体进 行抵抗。这些自身抗原或自身抗体在疾病表型显现的前期往往已经产生,并且表达量通 常随着病情的演化呈现出一定的趋势。根据这一特点,这些自身抗原或自身抗体可被当 做诊断疾病的生物标志物。

[0003] 生物标志物是一种测量工具,科研人员利用生物标志物诊断疾病的发生、复发、预后,并用于治疗效果的动态评估。及时对系统性红斑狼疮的诊断仍是一个巨大的挑战, 能早期准确地诊断出系统性红斑狼疮的生物标志物是关键。优良的系统性红斑狼疮生物 标志物应该具备的条件是:能准确地对系统性红斑狼疮进行诊断;诊断过程对患者无不 良反应。目前,疾病生物标志物主要包括基因水平标志物、细胞水平标志物和血清水平 标志物等。对于系统性红斑狼疮,已知的免疫靶标(或是自身抗原) 主要为细胞核组分, 包括ds-DNA染色体相关蛋白, Ro蛋白 (SSA) , La蛋白 (SSB) 及Sm蛋白。对于系 统性红斑狼疮的诊断,自1971年美国风湿病学会 (American College of Rheumatology, ACR, 1988年前称 American Rheumatism Association, ARA) 首次制定了系统性红斑狼 疮诊断标准以来,系统性红斑狼疮的临床诊断标准就在不断完善中。在1982年的修订 中首次增加了血清学指 标(抗核抗体、抗ds-DNA抗体和抗Sm抗体),并在制订过程 中采用生物统计分析,经验证后用于临床诊断。1997年的修订中,增加了“抗心磷脂抗 体阳性和狼疮抗凝物阳性”这一标 准,虽然未经过验证,但血清学标志物一直是研究重 点。(J Nephrol Dialy Transplant [J] Vol.22No.2Apr.2013:153-157.)

[0004] 血清蛋白组学是寻找系统性红斑狼疮的有效手段之一。在自身免疫病发生、发展的 过程中,自身抗体表达量的变化会影响血清蛋白质组的组成,这在血清生物标志物的发

现中具有重要价值。因此,越来越多科研人员将目光定格在血清蛋白质标志物的研究上,力求在蛋白质组学层面上寻找生物标志物,建立诊断、预后、药效评估的多参数模型。

[0005] 目前已有的系统性红斑狼疮标志物包括抗核抗体(ANAs)、抗ds-DNA抗体和抗Sm抗体等。抗核抗体作为该病的标志物在病人体内普遍存在,在诊断标准中,抗核抗体的标准指未用药物诱发“药物性狼疮”情况下,免疫荧光或相当于该法的其他实验抗核抗体滴度异常;抗dsDNA抗体的血清水平与疾病活动度和肾功能损害显著相关,通过检测抗dsDNA抗体水平可以预测疾病的复发,并且在疾病恶化前能够检测到更高水平的抗dsDNA抗体。(Medical Recapitulate[J], Aug. 2015, Vol. 21, No. 16:2956-2958.) 虽然抗核抗体高度灵敏,但却在其他自身免疫病病人血清中出现,如系统性硬化症、肌炎、自身免疫性溶血性贫血、类风湿和多发性硬化症(Arthritis&Rheumatism Vol. 47, No. 4, August 15, 2002:434-444.) ;抗dsDNA抗体和抗Sm抗体虽然在诊断系统性红斑狼疮中特异性更加显著,但并不是普遍出现在病人血清中(Arthritis&Rheumatism Vol. 47, No. 5, October 15, 2002:546-555)。抗核抗体等自身抗体能预示疾病的发生,但特异性的缺乏阻碍了它们成为可用的预测性生物标志物。自身抗体因其在自身免疫疾病发病机制的中心地位,仍然是疾病早期诊断的研究热点。科研人员希望找到特异性显著,灵敏度高的自身抗体作为生物标志物,这样不仅能探测疾病的发生,还能对疾病严重程度进行区分。

[0006] 对准确高效的生物标志物的追求促使生物标志物筛选方法层出不穷。在这个高通量技术不断发展的时代,科研人员通过建库的方式,以期在大量候选物中找出在病人和健康人血清中差异性显著的化学分子。2013年,Jiexia Quan等通过合成拟肽库作为自身抗原的替代物,筛选出了针对系统性红斑狼疮特异性为97.5%,灵敏度为70%的化合物标志物(Journal of Immunological Methods 402 (2014) 23-34.)。除了化学合成的拟肽以外,可作为候选物的还有蛋白质和多肽。

[0007] 蛋白质芯片自出现以来已成为探究生物分子-蛋白质相互作用和筛选生物标志物的有力工具,它通过一定方式将大量蛋白质分子按照预设排列顺序点制并固定在固相载体表面形成微阵列,将待分析样品与芯片进行孵育,洗去未能与芯片上蛋白质结合的成分,然后用荧光标记的抗体进行孵育,最后在荧光扫描仪下读取各点的荧光信号值。血清中蛋白质的含量非常不均一,而自身抗体往往丰度都很低,普通质谱难以解决不同样品中自身抗体表达差异巨大的问题,但是蛋白质芯片则以其全局性、无偏性、高通量的特点可克服常规质谱的缺陷。利用蛋白质芯片可以在短时间内确定病人与健康人之间的差异,高效地寻找血清标志物。

[0008] 多肽展示库技术种类繁多,从表达载体来看,有噬菌体展示库、细菌展示库、酵母展示库、细胞展示库等;从表达物质种类来看,有cDNA库、mRNA库、多肽库等。相比于其他展示技术,噬菌体展示的最大优点即高通量和多样性。噬菌体展示库是上个世纪80年代发展起来的一项高通量筛选技术。21世纪以来,随着高通量测序技术的兴起,噬菌体展示库技术迎来了新的发展高潮。噬菌体展示库通过将基因信息和蛋白质联系在一起,研究蛋白质与蛋白质,蛋白质与多肽,蛋白质与DNA的相互作用。目前已有的噬菌体展示库包括组学肽库和随机肽库,采用噬菌体展示库已实现了成千上万样本的平行分析。2010年, H. Benjamin Larman等人通过将人类蛋白质组表达于T7噬菌体中,构建了第一个人类蛋白质组噬菌体展示库,通过该展示库筛选出副肿瘤性神经系统疾病自身抗体(Nature

Biotechnology. Vol 29, No. 6 JUNE 2011: 535-541)。在这之后,噬菌体展示库以其高通量的优点配合目前发展的二代测序技术,完成了许多血清学方面的探测工作。随机肽库的淘选加上二代测序技术可用于表位的确定,也可用于确定自身抗原等其他免疫相关蛋白的相互作用情况。2015年,Christiansen A等人通过将噬菌体展示库与二代测序结合的方法探测花生过敏患者血清中IgE与自身抗原的作用表位(Sci Rep. 12913 (2015))。类似的工作还有很多,但是通过随机肽库筛选系统性红斑狼疮的生物标志物未见报道,因此,我们通过高通量的噬菌体展示库技术来筛选在病人和正常人中区分度高的多肽,以期得到对系统性红斑狼疮更有效的早期诊断标志物。

## 发明内容

[0009] 针对现存的技术问题以及更准确的系统性红斑狼疮血清标志物发现的需要,本发明提供一种多肽SLE2018-V002(多肽序列为TIGVVRDVATQL)在诊断系统性红斑狼疮试剂盒中的应用,来定性检测人血清中抗该多肽的IgG抗体的水平,作为辅助系统性红斑狼疮诊断的一种手段,有望大大提高系统性红斑狼疮早期诊断的敏感性和特异性。

[0010] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0011] 第一方面,本发明提供了一种多肽SLE2018-V002,所述多肽的氨基酸序列为:TIGVVRDVATQL。

[0012] 第二方面,本发明提供了一种多肽SLE2018-V002在制备诊断系统性红斑狼疮的组合物中的应用。

[0013] 具体是:用合成的多肽SLE2018-V002抗原通过环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)连接在牛血清白蛋白( BSA)上包被微孔板,制成固相抗原,往包被抗原的微孔中依次加入待测血清,再加入含有辣根过氧化物酶(HRP)标记的anti-Human IgG抗体的酶标试剂,形成多肽SLE2018-V001-抗体-酶标二抗复合物,经过彻底洗涤后加酶底物溶液3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色。TMB在HRP酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,然后终止反应,通过OD<sub>450</sub>值检测样品中特异性识别抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体水平。

[0014] 优选地,所述多肽SLE2018-V002是从M13噬菌体随机多肽库中淘选而得到。

[0015] 第三方面,本发明提供了一种诊断系统性红斑狼疮的诊断试剂盒,包括多肽SLE2018-V002。

[0016] 优选地,所述多肽SLE2018-V002通过环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)与BSA偶联,形成SMCC-BSA-多肽偶联产物。

[0017] 优选地,所述试剂盒还包括标准品、包被缓冲液、封闭液、样品稀释液、终止液、酶标试剂、酶底物溶液和洗涤液。

[0018] 优选地,所述标准品包括抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的浓度为0U/mL的标准血清1和抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的浓度为100U/mL的标准血清2;所述标准血清1为正常人血清,标准血清2为SLE2018-V001抗体为阳性的血清;

[0019] 所述多肽SLE2018-V002抗原采用包被缓冲液稀释,所述包被缓冲液为0.05M、pH 9.6的碳酸盐缓冲液,即每1L溶液中含1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,2.93g NaHCO<sub>3</sub>;

[0020] 所述封闭液为含0.5%牛血清白蛋白的0.01M、pH 7.4的磷酸盐-NaCl缓冲液(PBS)

溶液,即每1L中含有5g牛血清白蛋白 (BSA) ,8g NaCl,0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,2.9g Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O,0.2g KCl。

[0021] 优选地,步骤C中,所述酶底物溶液包括:显色剂A:500mL溶液中含醋酸钠13.6 g,柠檬酸1.6g,30%双氧水0.3mL;显色剂B:500mL溶液中含TMB 350mg,DMSO 20 mL,柠檬酸•H<sub>2</sub>O 5.1g。

[0022] 优选地,步骤B中,所述标准品与待测血清样品采用样品稀释液进行稀释,所述样品稀释液为0.01M pH 7.4磷酸盐-NaCl缓冲液 (PBS) ;

[0023] 所述洗涤采用的洗涤液为含0.05%Tween-20的、0.01±0.005M、pH 7.4±0.05 磷酸盐-NaCl缓冲液 (PBST) ,即每1升溶液中含8g NaCl,0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,2.9g Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O,0.2g KCl,0.5mL Tween-20;

[0024] 所述终止液为2±0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液;

[0025] 所述酶标试剂为含有辣根过氧化物酶标记的anti-Human IgG抗体的酶标试剂。

[0026] 优选地,所述试剂盒中采用的各试剂还包含防腐剂,以便于保存。

[0027] 第四方面,本发明提供了一种定性检测人血清中抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的方法,包括以下步骤:

[0028] A、将多肽SLE2018-V002通过SMCC与BSA偶联;

[0029] B、将偶联后的多肽通过稀释后包被在酶标板上的微孔内制成固相抗原,加入封闭液;

[0030] C、将标准品与待测血清样品稀释后加入各自的抗原测定孔中,温育后,每孔加入含有辣根过氧化物酶标记的anti-Human IgG抗体的酶标试剂,形成SLE2018-V001-抗体-酶标二抗复合物;

[0031] D、经步骤C处理后,彻底洗涤,加酶底物溶液显色,然后加入终止液终止反应,通过OD<sub>450</sub>值即得样品中抗多肽SLE2018-V001的IgG抗体的水平。

[0032] 优选地,步骤A中,所述多肽SLE2018-V002通过SMCC与BSA偶联的步骤具体包括:

[0033] A1、将环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC) 加入含BSA的缓冲液PBS中,混匀, 25℃反应1h,得BSA-SMCC溶液;

[0034] A2、向多肽SLE2018-V002溶液中加入BSA-SMCC溶液,混匀后静置于25℃下4至6 小时,即得偶联产物BSA-SMCC-多肽SLE2018-V001。

[0035] 更优选地,步骤A1中,所述SMCC与BSA的质量比为1:5;

[0036] 所述BSA-SMCC溶液的浓度为4mg/mL。

[0037] 本发明利用噬菌体随机多肽展示库和二代测序高通量、快速分析的优势,发展了一套快速获取疾病血清标志物的技术。通过对200份系统性红斑狼疮血清(病人100例,健康病人100例)进行分析,在短时间内比较了患者和健康人血清IgG反应性的不同,筛选出本发明的血清标志物——多肽SLE2018-V002,该多肽有望用于早期诊断系统性红斑狼疮。

[0038] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0039] 1、本发明提供的血清标志物的特异性为61%,灵敏度为80%,具有高特异性和高灵敏度的特点。

[0040] 2、本发明提供一种灵敏、安全、可靠、易操作的可商品化试剂盒,定性测定人血清中抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的水平,有助于辅助早期诊断系统性红斑狼疮。

## 附图说明

- [0041] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:
- [0042] 图1为本发明实施例1制备偶联PBS的多肽的电泳验证结果;
- [0043] 图2为本发明实施例1获得的ROC曲线。

## 具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变化和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0045] 实施例1

[0046] 1、准备多肽并将多肽与BSA偶联

[0047] 1) 多肽SLE2018-V002 (氨基酸序列为:TIGVVRDVATQL) 是采用HPLC方法由吉尔生化(上海)有限公司合成的C端连接有半胱氨酸的多肽。从Thermo购买SMCC(环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯) (货号22360)。用DMSO(二甲基亚砜)溶解,终浓度为 100mg/mL,于-20℃保存。保质期一个月。

[0048] 2) 称取10mg BSA,加入1mL偶联缓冲液PBS,配成10mg/mL的BSA溶液。

[0049] 3) 取2mg SMCC (与BSA是1:5的关系),加入到上述载体蛋白溶液中,混匀,25℃反应1h。

[0050] 4) 在10KD透析袋中,透析过夜。

[0051] 5) 将透析好的载体蛋白溶液置于新的离心管中,加入原偶联缓冲液,将激活的BSA-SMCC浓度稀释到4mg/mL。

[0052] 6) 取多肽SLE2018-V002 1mg于Eppendorf管中,加入10μL DMSO将多肽溶解。加入200μL PBS重悬得多肽SLE2018-V002溶液,并测其pH在7.0~7.5内。

[0053] 1、向多肽中加入200μL激活好的BSA-SMCC (浓度为4mg/mL),混匀后静置于25℃ 4至6小时。

[0054] 2、偶联完成后加PBS定容至0.8mL,此时溶液浓度为1mg/mL。

[0055] 3、电泳验证偶联情况。

[0056] 结果如图1所示,如图所示蛋白条带从左至右依次是: Marker, BSA, BSA-SMCC, BSA-SMCC-多肽SLE2018-V002。可以看出BSA经过偶联SMCC后分子量出现20kD左右的变化, BSA-SMCC偶联多肽后出现了较小的分子量变化,由于多肽由12个氨基酸组成,所以分子量变化不大,但依旧可以看出多肽已经偶联成功。

[0057] 2、血清样本的准备:

[0058] 全血标本于室温放置2小时或4℃过夜后于1000g离心20分钟左右,取上清即可立即检测;或进行分装,并将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。解冻后的样品应再次离心,然后检测。所检测样品中不能含有NaN<sub>3</sub>,因为NaN<sub>3</sub>抑制辣根过氧化物酶(HRP)的活性。

[0059] 3、ELISA法各种缓冲液及试剂的配制方法:

[0060] (1) 包被缓冲液:0.05M pH 9.6的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>,组成如下表1所示。

[0061] 表1

包被缓冲液	质量 (g)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59
NaHCO <sub>3</sub>	2.93
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

[0063] (2) 样品稀释液:pH 7.4 PBS溶液,组成如下表2所示。

[0064] 表2

品稀释液	质量 (g)
NaCl	8.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O	2.9
KCl	0.2
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

[0066] (3) 洗涤液:pH 7.4的PBST溶液,组成如下表3所示。

[0067] 表3

洗涤液	质量 (g)
NaCl	8.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O	2.9
KCl	0.2
Tween-20	0.5 mL
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

[0069] (4) 封闭液:0.5% BSA的pH 7.4PBS溶液,组成如下表4所示。

[0070] 表4

封闭液	质量 (g)
BSA	5.0
NaCl	8.0
[0071] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O	2.9
KCl	0.2
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

[0072] (5) 酶底物溶液: 显色剂A和显色剂B((现配现用), 组成如下表5和6所示。

[0073] 表5显色剂A

显色剂 A	质量
醋酸钠	13.6 g
[0074] 柠檬酸	1.6 g
30%双氧水	0.3 mL
ddH <sub>2</sub> O	加至 500 mL

[0075] 表6显色剂A

显色剂 B	质量
TMB	350 mg
[0076] DMSO	20 mL
柠檬酸 • H <sub>2</sub> O	5.1 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 500 mL

[0077] (6) 终止液: 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(配时将浓硫酸缓慢滴入蒸馏水中, 边加边混匀), 组成如下表7所示。

[0078] 表7

终止液	质量
[0079] 浓硫酸 (95%-98%)	22.2 mL
ddH <sub>2</sub> O	加至 500 mL

[0080] 4、ELISA法测定血清中抗多肽SLE2018-V002的IgG抗体的浓度, 以辅助诊断系统性红斑狼疮, 具体操作步骤如下:

[0081] (1) 包被: 将纯化的多肽SLE2018-V002溶液用包被缓冲液稀释至1μg/mL, 加入到96孔酶标板中, 每孔100μL, 37℃包被2小时或4℃过夜; 洗涤液洗板1次, 甩干。

- [0082] (2) 封闭:加入封闭液200 $\mu$ L,室温保温2小时;洗涤液洗板1次,甩干。
- [0083] (3) 标准品与样品的稀释与加样:将标准品(抗多肽SLE2018-V001的IgG抗体的浓度为0U/mL标准血清1和抗多肽SLE2018-V001的IgG抗体的浓度为100U/mL标准血清2;所述标准血清1为正常人血清,标准血清2为SLE2018-V001抗体为阳性的血清)与待测血清样品1:100用样品缓冲液稀释至100 $\mu$ L,加入到各自的抗原测定孔板中。注意不要有气泡,加样将样品加于梅标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,酶标板上加盖或覆膜。若待测血清样品较多,建议使用多管微量加液器加样。标准品及待检测样品临用前15分钟内配制,用完丢弃,下次检测使用新鲜配制的标准品。
- [0084] (4) 温育:酶标板置于37℃反应120分钟,甩净孔中液体,洗涤6次。
- [0085] (5) 加酶:每孔加辣根过氧化物酶标记的anti-Human IgG抗体100 $\mu$ L,37℃,60分钟。甩净孔中液体,同上洗板6次拍干。
- [0086] (6) 显色:拍干后各孔先滴加显色剂A 50 $\mu$ L,再加入显色剂B 50 $\mu$ L,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15分钟。
- [0087] (7) 终止:依序每孔加终止液50 $\mu$ L,终止反应。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。底物反应时间到后应尽快加入终止液。
- [0088] (8) 结果判定:
- [0089] i. 用酶联仪在450nm波长依序测量各孔的光密度(OD值)。
- [0090] 单位值(U/mL) = (A450<样品>-A450<标准血清1>)/(A450<标准血清2>-A450<标准血清1>) × 100
- [0091] \*A450是450nm处吸光度的缩写。
- [0092] \*目前多肽等抗体尚无国际通行的参考标准,因此本检测结果校准时采用了相对单位。
- [0093] ii. 血清中抗多肽SLE2018-V002值的判定 单位值 $\geq$ 100U/mL:可初步诊断该病人为系统性红斑狼疮患者 单位值<100U/mL:不能诊断该病人为系统性红斑狼疮患者
- [0094] iii. 质量控制
- [0095] 每个检测结果必须符合以下标准:
- [0096] 标准血清1的A450: $\leq$ 0.100
- [0097] 标准血清2的A450: $\geq$ 0.700
- [0098] 如不符合上述标准,则结果视为无效,必须重新检测。
- [0099] iv. 检验结果的解释
- [0100] 对50例健康人血清、50例患者血清的ROC分析确立了以上参考值。
- [0101] 特异性和灵敏度检测:采用100份自身免疫疾病相关患者的血清(系统性红斑狼疮患者50份,健康人50份)对本发明的诊断试剂盒进行了特异性和敏感性检测。检测吸光值OD<sub>450</sub>后利用SPSS17.0得到ROC曲线(结果如图2所示,横坐标为1-特异性,纵坐标为灵敏度)。本发明的诊断试剂盒辅助诊断系统性红斑狼疮的特异性为74%,灵敏度为88%,AUC=0.81,均提高了现有技术中系统性红斑狼疮诊断的指标。
- [0102] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变化或修改,这并不影响本发明的实质内容。在不冲突的情况下,本申请的实施例和实施例中的特征可以任意相

互组合。

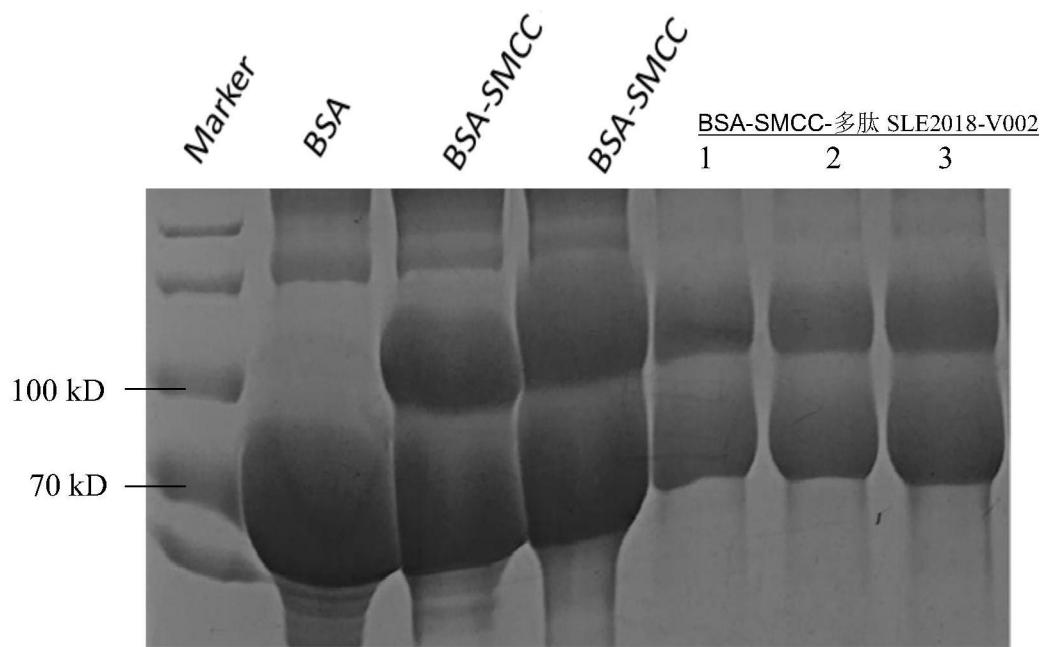


图1

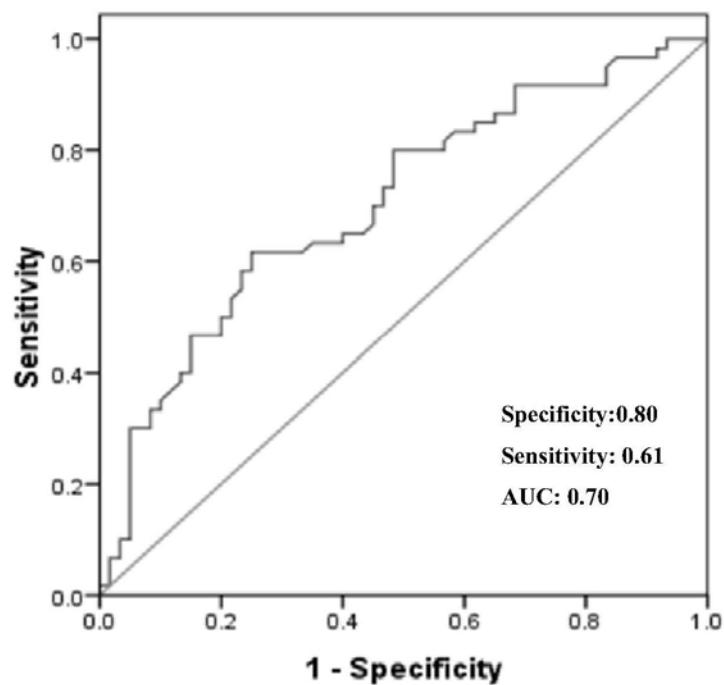


图2

专利名称(译)	多肽SLE2018-V002在诊断系统性红斑狼疮试剂盒中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109725156A</a>	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201811592274.9	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	陶生策 吴凡林 祁环 李华 胡传圣 赵小东 沈南 唐元家 郭强 丁慧华		
发明人	陶生策 吴凡林 祁环 李华 赖丹昀 胡传圣 赵小东 沈南 唐元家 郭强 丁慧华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/564		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开一种多肽SLE2018-V002在诊断系统性红斑狼疮试剂盒中的应用。所述SLE2018-V002的氨基酸序列为：TIGVVRDVATQL。本发明采用临床广泛使用的酶联免疫吸附检测(ELISA)技术，应用间接法定性检测人血清中抗TIGVVRDVATQL多肽的IgG抗体的水平。通过本发明所提供的试剂盒，将作为辅助系统性红斑狼疮早期诊断的一种手段，可大大提高系统性红斑狼疮早期诊断的特异性和灵敏度，其特异性为61%、灵敏度为80%。

