



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113238039 A

(43) 申请公布日 2021.08.10

(21) 申请号 202010825414.3

(22) 申请日 2018.03.07

(62) 分案原申请数据

201810186409.5 2018.03.07

(71) 申请人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾  
大道2076号中国高科大厦六楼A2

(72) 发明人 张大准 王洪涛 张永顶

(74) 专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事

务所(普通合伙) 44285

代理人 常忠良

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

权利要求书1页 说明书18页

(54) 发明名称

一种检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及生物检测技术领域,特别涉及一种检测试剂盒。该试剂盒包括柠檬酸、甘露醇、PVA2W、PEG1W、阿拉伯树胶、对羟基苯甲酸钠中的一种或两者以上的混合物;该检测试剂盒具有高度灵敏和特异性,可以一次检测12种抗体,具有较高的准确性、操作简便、节约抗原、降低成本等优点,同时优化了相关的试剂配方和处理方法,使试剂盒的稳定性更好(2-8℃冷藏2年,室温可储存6个月),储存及运输条件更为便利。

1. 一种检测试剂盒,其特征在于,包括柠檬酸、甘露醇、PVA2W、PEG1W、阿拉伯树胶、对羟基苯甲酸钠中的一种或两者以上的混合物;

所述检测试剂盒中所述柠檬酸、甘露醇、PVA2W的体积比为(1~1.5):(0.3~0.6):(0.8~1.5)或

所述组合物包括如下组分:

柠檬酸	0.05M
PEG1W	1.5~2% (v/v)
阿拉伯树胶	0.1~0.2% (g/v)
对羟基苯甲酸钠	0.2~0.5% (v/v)。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,还包括BSA、Proclin300、PBS或磷酸氢二钠中的一种或两者以上的混合物。

3. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于,所述BSA在所述组合物中的质量体积百分含量为1~2.5%;

所述Proclin300在所述组合物中的体积百分含量为0.05%;

所述PBS的浓度为0.01M;

所述磷酸氢二钠的浓度为0.01M。

4. 根据权利要求3所述的检测试剂盒,其特征在于,还包括自身免疫性肾病相关抗原;所述自身免疫性肾病相关抗原包括GBM、PR3、MPO、LF、LAMP-2、PLA2R、THSD7A、PT蛋白、内皮细胞、C1q、dsDNA、核小体中的至少一种。

5. 根据权利要求4所述的检测试剂盒,其特征在于,还包括标记物、样品稀释液、洗涤液、显色液中的一种或两者以上的混合物。

6. 根据权利要求5所述的检测试剂盒,其特征在于,所述标记物为标记偶联物标记的抗人IgG抗体;

所述标记偶联物包括酶标记物、亲和素或吡啶酯;

所述酶标记物为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

所述抗人IgG抗体为兔抗人IgG抗体或羊抗人IgG抗体;

所述样品稀释液为包含0.15M NaCl、0.05% Tween20、0.01% 酪蛋白的pH7.4的0.02M Tris溶液;

所述洗涤液为包含0.15M NaCl、0.05% Tween20的pH7.4的0.02M Tris溶液;

所述显色液为ECL。

## 一种检测试剂盒

[0001] 本申请是申请日为2018年03月07日、发明名称为“一种组合物、芯片及其制备方法和包含有该芯片的检测装置”、申请号为201810186409.5的发明的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及生物检测技术领域,特别涉及一种检测试剂盒。

### 背景技术

[0003] 自身免疫相关性肾炎是由于自身抗原和自身抗体相结合形成免疫复合物沉积在肾脏,导致肾脏损伤的一类疾病。包括狼疮性肾炎(LN),原发性膜性肾病(PMN),抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性肾损害等。至今在中国免疫性肾炎的发病率仍然很高。该病为潜在病理改变的持续性或进行性发展,使病情迁延,成为慢性,而不单纯是急性肾炎的慢性阶段。早期诊断有助于自身免疫性疾病的临床控制。研究已发现大部分的自身免疫性肾病患者血清中存在着特异性自身抗体,例如ANCA相关血管炎的抗髓过氧化物酶(MPO)抗体、抗蛋白酶3抗体(PR3)、抗肾小球基底膜抗体(GBM)、抗内皮细胞抗体、抗乳铁蛋白(LF)抗体、抗人溶酶体相关膜蛋白(LAMP-2)抗体;狼疮性肾炎(LN)的抗C1q抗体、抗核小体(Nucleosome)抗体和抗双链DNA(dsDNA)抗体,原发性膜性肾病(IMN)的抗磷脂酶A2受体(PLA2R)抗体和1型血小板反应蛋白7A(THSD7A)抗体,还有本公司研究制备的抗磷脂酶A2受体(PLA2R)与1型血小板反应蛋白7A域(THSD7A)融合的融合蛋白PT蛋白抗体,这些特异性自身抗体是自身免疫性肾病诊断标准中重要的组成部分。

[0004] 目前有很多检测自身免疫相关性肾炎抗体的方法,包括间接免疫荧光分析法、酶联免疫吸附法或免疫印迹法,但还是存在各自的缺点。间接免疫荧光分析法是通过形成的荧光结合物来推断自身抗体的类别,缺乏一个具体客观的诊断,需要利用其他技术进行二次证实,如免疫印迹法、酶联免疫法等。酶联免疫吸附法一次试验只能检测单一抗体,效率低,成本较高,在诊断应用方面存在一定的局限性。免疫印记法所需标本量大、操作繁琐、检测时间过长、成本较高等问题。且试剂盒的稳定期一般都是2-8℃稳定期1年。

[0005] ELISA-Array技术不但保持着ELISA方法的操作简便、成本低的优点,而且具有蛋白芯片技术高通量的优点;该技术通过点样仪以微阵列的形式将多种标记物固定于微孔板板孔内,可同时检测多种病原体。它可以在一个微孔中实现一份样本的多种检测,大大减少了标本和试剂的量。但目前国内尚无针对自身免疫性肾病的ELISA-Array技术检测的研究。因此,提供一种高度灵敏和特异的、稳定性更好的自身免疫相关性肾炎抗体的检测试剂盒具有重要的现实意义。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种检测试剂盒。该试剂盒可以一次检测12种抗体,具有较高的准确性、操作简便、节约抗原、降低成本等优点,同时优化了相关的试剂配方和处理方法,使试剂盒的稳定性更好(2-8℃冷藏2年,室温可储存6个月),储存及运输条件更为便利。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0008] 本发明提供了一种检测试剂盒,包括柠檬酸、甘露醇、PVA2W、PEG1W、阿拉伯树胶、对羟基苯甲酸钠中的一种或两者以上的混合物;

[0009] 所述检测试剂盒中所述柠檬酸、甘露醇、PVA2W的体积比为(1~1.5):(0.3~0.6):(0.8~1.5)或

[0010] 所述组合物包括如下组分:

[0011]	柠檬酸	0.05M
	PEG1W	1.5~2% (v/v)
	阿拉伯树胶	0.1~0.2% (g/v)
	对羟基苯甲酸钠	0.2~0.5% (v/v)。

[0012] 在本发明的一些具体实施方案中,还包括BSA、Proclin300、PBS或磷酸氢二钠中的一种或两者以上的混合物。

[0013] 在本发明的一些具体实施方案中,所述BSA在所述组合物中的质量体积百分含量为1~2.5%;

[0014] 所述Proclin300在所述组合物中的体积百分含量为0.05%;

[0015] 所述PBS的浓度为0.01M;

[0016] 所述磷酸氢二钠的浓度为0.01M。

[0017] 在本发明的一些具体实施方案中,还包括自身免疫性肾病相关抗原;所述自身免疫性肾病相关抗原包括GBM、PR3、MPO、LF、LAMP-2、PLA2R、THSD7A、PT蛋白、内皮细胞、C1q、dsDNA、核小体中的至少一种。

[0018] 在本发明的一些具体实施方案中,还包括标记物、样品稀释液、洗涤液、显色液中的一种或两者以上的混合物。

[0019] 在本发明的一些具体实施方案中,所述标记物为标记偶联物标记的抗人IgG抗体;

[0020] 所述标记偶联物包括酶标记物、亲和素或吡啶酯;

[0021] 所述酶标记物为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

[0022] 所述抗人IgG抗体为兔抗人IgG抗体或羊抗人IgG抗体;

[0023] 所述样品稀释液为包含0.15M NaCl、0.05% Tween20、0.01% 酪蛋白的pH7.4的0.02M Tris溶液;

[0024] 所述洗涤液为包含0.15M NaCl、0.05% Tween20的pH7.4的0.02M Tris溶液;

[0025] 所述显色液为ECL。

[0026] 本发明还提供了一种组合物,包括柠檬酸、甘露醇、PVA2W、PEG1W、阿拉伯树胶、对羟基苯甲酸钠中的一种或两者以上的混合物。

[0027] 在本发明的一些具体实施方案中,所述组合物中柠檬酸、甘露醇、PVA2W的体积比为(1~1.5):(0.3~0.6):(0.8~1.5)。

[0028] 在本发明的另一些具体实施方案中,所述组合物中包括如下组分:

	柠檬酸	0.05M
[0029]	PEG1W	1.5~2% (v/v)
	阿拉伯树脂	0.1~0.2% (g/v)
	对羟基苯甲酸钠	0.2~0.5% (v/v)。

[0030] 在本发明的另一些具体实施方案中,所述组合物还包括BSA、Proclin300、PBS或磷酸氢二钠中的一种或两者以上的混合物。

[0031] 在本发明的另一些具体实施方案中,所述BSA在所述组合物中的质量体积百分含量为1~2.5%;

[0032] 所述Proclin300在所述组合物中的体积百分含量为0.05%;

[0033] 所述PBS的浓度为0.01M;

[0034] 所述磷酸氢二钠的浓度为0.01M。

[0035] 本发明还提供了所述的组合物在制备芯片和/或检测装置中的应用。

[0036] 本发明还提供了一种芯片,其包被有所述的组合物。

[0037] 在本发明的一些具体实施方案中,所述芯片还包被有自身免疫性肾病相关抗原。

[0038] 在本发明的一些具体实施方案中,所述自身免疫性肾病相关抗原包括GBM、PR3、MPO、LF、LAMP-2、PLA2R、THSD7A、PT蛋白、内皮细胞、C1q、dsDNA、核小体中的至少一种。

[0039] 在本发明的一些具体实施方案中,所述芯片还包含质控点和/或参考点;所述质控点包含至少一个阳性质控点(PC)、至少一个阴性质控点(NC)、至少一个样品质控点(SC)和/或至少一个酶标质控点(EC);所述参考点包含不同浓度的参考曲线点(S1-S3)和/或至少一个芯片位置参考点(Loc)。

[0040] 在本发明的一些具体实施方案中,所述阳性质控点包被人IgG或包被BSA-DNP偶联物;所述阴性质控点包被低于反应信号值的微量浓度的人IgG或其他的与自身免疫性肾病无关的蛋白;所述样品质控点为包被抗人IgG;所述酶标质控点包被人IgG、抗兔的抗体或抗羊的抗体;所述参考曲线点包被不同浓度的人IgG;所述芯片位置参考点包被已知浓度的人IgG溶液。

[0041] 本发明提供了所述的芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0042] 步骤1:将所述自身免疫性肾病相关抗原、所述质控点的蛋白和/或所述参考点的蛋白经包被缓冲液稀释后,以点阵列形式包被于所述芯片的基质;

[0043] 步骤2:经封闭稳定剂对所述芯片进行封闭;

[0044] 所述封闭稳定剂包括所述的组合物。

[0045] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂中含有1%~2%BSA(g/v),优选1%BSA(g/v)。

[0046] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂中还含有1%~1.5%的柠檬酸(v/v),优选1%的柠檬酸(v/v)。

[0047] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂中还含有0.3%~0.6%的甘露醇(v/v),优选0.5%的甘露醇(v/v)。

[0048] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂中还含有0.8%~1.5%的PVA2W(v/v),优选1%的PVA2W(v/v)。

[0049] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂中还含有0.05% (v/v) 的Proclin300。

[0050] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂为含有1%~2% BSA (g/v), 1%~1.5% 的柠檬酸 (v/v), 0.3%~0.6% 的甘露醇 (v/v), 0.8%~1.5% 的PVA2W (v/v) 和0.05% (v/v) 的Proclin300的0.01M的磷酸氢二钠溶液。

[0051] 在本发明的一些具体实施方案中,所述封闭稳定剂为含有1% BSA (g/v), 1% 的柠檬酸 (v/v), 0.5% 的甘露醇 (v/v), 1% 的PVA2W (v/v) 和0.05% (v/v) 的Proclin300的0.01M的磷酸氢二钠溶液。

[0052] 本发明还提供了所述的制备方法制得的芯片。

[0053] 本发明还提供了一种检测装置,包括上述的芯片。

[0054] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂包括0.01M PBS。

[0055] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂还包括0.05M的柠檬酸。

[0056] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂还包括1.5%~2.5% (g/v) 的BSA,优选2% (g/v) 的BSA。

[0057] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂还包括1.5%~2% (v/v) 的PEG1W,优选2% (v/v) 的PEG1W。

[0058] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂还包括0.1%~0.2% (g/v) 的阿拉伯树胶,优选0.1% (g/v) 的阿拉伯树胶。

[0059] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂还包括0.2%~0.5% 的对羟基苯甲酸钠 (v/v),优选0.3% 的对羟基苯甲酸钠 (v/v)。

[0060] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂还包括0.05% (v/v) 的Proclin300。

[0061] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;所述酶标稀释稳定剂包括0.01M PBS,0.05M的柠檬酸,1.5%~2.5% (g/v) 的BSA,1.5%~2% (v/v) 的PEG1W,0.1%~0.2% (g/v) 的阿拉伯树胶,0.2%~0.5% 的对羟基苯甲酸钠 (v/v) 以及0.05% (v/v) 的Proclin300。

[0062] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括酶标稀释稳定剂;

[0063] 所述酶标稀释稳定剂包括0.01M PBS,0.05M的柠檬酸,2% (g/v) 的BSA,2% (v/v) 的PEG1W,0.1% (g/v) 的阿拉伯树胶,0.3% 的对羟基苯甲酸钠 (v/v) 以及0.05% (v/v) 的Proclin300。

[0064] 在本发明的一些具体实施方案中,所述检测装置还包括标记物、样品稀释液、洗涤液、显色液中的一种或两者以上的混合物。

[0065] 在本发明的一些具体实施方案中,所述标记物为标记偶联物标记的抗人IgG抗体;

[0066] 所述标记偶联物包括酶标记物、亲和素或吡啶酯;

[0067] 所述酶标记物为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

[0068] 所述抗人IgG抗体为兔抗人IgG抗体或羊抗人IgG抗体;

[0069] 所述样品稀释液为包含0.15M NaCl、0.05% Tween20、0.01% 酪蛋白的pH7.4的0.02M Tris溶液；

[0070] 所述洗涤液为包含0.15M NaCl、0.05% Tween20的pH7.4的0.02M Tris溶液；

[0071] 所述显色液为ECL。

[0072] 本发明还提供了一种基于所述的检测装置的自身免疫性肾病的检测方法，取待测样品用所述样品稀释液稀释后包被到所述芯片上，加入所述标记物，加入所述显色液避光显色，荧光检测装置检测结果，获得待测样品中的自身免疫性肾病的相关抗体信号值。

[0073] 本发明利用ELISA-Array技术，制备了一种高度灵敏和特异的自身免疫相关性肾炎抗体的检测试剂盒，它可以一次检测12种抗体，具有较高的准确性、操作简便、节约抗原、降低成本等优点，同时优化了相关的试剂配方和处理方法，使试剂盒的稳定性更好(2-8℃冷藏2年，室温可储存6个月)，储存及运输条件更为便利。

### 具体实施方式

[0074] 本发明公开了一种检测试剂盒，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0075] 本发明采用的蛋白质芯片技术，制备了高通量、多检测指标、性能稳定、重复性好，准确度高的自身免疫性肾病相关自身抗体谱蛋白芯片试剂盒。

[0076] 本发明提供的试剂盒包括一种蛋白芯片，通过高精密度的点样仪将GBM、PR3、MPO、LF、LAMP-2、PLA2R、THSD7A、PT蛋白、内皮细胞、C1q、dsDNA、核小体这12种抗原以及所需要的参考点蛋白以4\*5的点阵列形式包被于芯片基质上，通过抗原抗体特异性反应的免疫学原理来捕获样品中对应的相关抗体。

[0077] 本发明的实施例中参考点包括：至少一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC)；至少一个样品质控点(SC)和一个酶标质控点(EC)；至少3个标准曲线点(S1-S3)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0078] 本发明的实施例中阳性质控点可以是人IgG，使用的酶联免疫标记物就是抗人IgG的标记物。在其他实施例中该点也可以包被BSA偶联的DNP，使用的酶联免疫标记物就是抗人IgG的标记物和抗DNP的标记物的混合液。

[0079] 本发明的实施例中，阴性质控点可以是低于反应信号值的微量浓度的人IgG，在其他实施例中也可以是其他无关蛋白。

[0080] 本发明的实施例中，样品质控点可以是羊抗人的IgG，在其他实施例中也可以用其他的抗人IgG，如兔抗人IgG，鼠抗人IgG等。

[0081] 本发明的实施例中，酶标质控点可以是人IgG(酶标是抗人IgG的酶标)，在其他实施例中也可以使用其他的：如抗兔的抗体(酶标用的是兔抗人IgG)，或者抗羊的抗体(酶标就用羊抗人的IgG)。

[0082] 本发明的实施例中，标准曲线点包被的是低、中、高三种浓度的人IgG，用于内部定标，结果的比对判读。

[0083] 本发明的实施例中,芯片本身的位置参考点包被的是2 $\mu$ g/ml的人IgG溶液,主要是对阵列取值时的定位作用。

[0084] 本发明的实施例中芯片基质为96孔酶标反应板,在其他的实施例中,该基质还可以是玻片、各种化学膜、多孔硅胶等适合蛋白质附着的载体。

[0085] 本发明提供的抗原包括上述12种抗原中的几种或多种,通过使用不同的抗原包被缓冲液均匀的包被于芯片基质上。所述抗原包被缓冲液是PH9.6的CB缓冲液、PH8.5的Tris缓冲液和PH7.4的PBS缓冲液,其中添加了海藻糖,甘油,PEG或者PVP,以及Proclin300防腐剂,同时添加了水溶性环糊精等添加物,使得包被效果更好,更稳定、均一,包被的点更规则、圆润、CV更小。所述PEG为PEG-400,所述水溶性环糊精可以是0.02%的2-羟基- $\beta$ -环糊精,也可以是Captisol、羧甲基- $\beta$ -环糊精等。

[0086] 所述芯片包被的条件是2-8 $^{\circ}$ C,24-30个小时过夜包被。

[0087] 包被结束需要对芯片进行封闭,本发明所用的封闭稳定剂是含有1%BSA,1%的柠檬酸,0.5%的甘露醇,另外还添加了1%的PVA2W和0.05%的Proclin300的0.01M的磷酸氢二钠溶液。

[0088] 本发明试剂盒所用酶标为HRP标记的兔抗人IgG,所述试剂盒包含的酶标工作液是用酶标稀释稳定剂将HRP标记的兔抗人IgG稀释至使用终浓度的酶标记物,所述酶标稀释稳定剂为0.01M PBS,0.05M的柠檬酸、2%的BSA(g/v)、2%(v/v)的PEG1W、0.1%(g/v)的阿拉伯树胶、0.3%(v/v)的对羟基苯甲酸钠、以及0.05%(v/v)的Proclin300。在其他实施例中,还可以使用其他的酶标抗人IgG,如羊抗人IgG;在其他实施例中,还可以使用其他的标记偶联物,如AP,亲和素,吡啶酯等。

[0089] 本发明使用的显色底物是增强型化学发光底物(ECL),通过荧光检测装置或仪器进行反应结果的读取。在其他实施例中也可以使用其他的显色底物,如p-NPP,TMB等。

[0090] 本发明利用ELISA-Array技术,制备了一种高度灵敏和特异的自身免疫性肾病抗体谱检测试剂盒该技术产品化后价格低廉,且试剂盒的稳定性比现在市面的相关产品(一般2-8 $^{\circ}$ C1年)都要好。

[0091] 本发明提供的检测试剂盒中所用原料及试剂均可由市场购得。

[0092] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0093] 实施例1~3

[0094] 1、芯片的包被:

[0095] 1) 芯片阵列设计以及抗原及参考点的具体分布如表1、表2所示:

[0096] 表1

[0097]

•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•

[0098] 表2

[0099]

PC	NC	GBM	LAMP-2	内皮细胞
SC	S1	PR3	PLA2R	核小体
EC	S2	MPO	THSD7A	dsDNA

Loc	S3	LF	PT蛋白	C1q
-----	----	----	------	-----

[0100] 2) 具体的包被过程:

[0101] 首先,按以下所述稀释抗体和相关蛋白:

[0102] 阵列中的PC、NC、S1、S2、S3、EC点分别包被的是2 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml的人IgG,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液(其中含2.5%的PEG4000、5%的海藻糖,0.05%的Proclin300,以及15%的甘油)。

[0103] SC点包被的是2 $\mu$ g/ml的羊抗人IgG抗体,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液(同上)。

[0104] Loc点包被的是2 $\mu$ g/ml的人IgG,稀释缓冲液是PH9.6的CB缓冲液。

[0105] 包被抗原的稀释:

[0106] dsDNA、核小体、C1q分别用PH7.4-PH7.6的0.01M的PBS缓冲液(其中含0.5%的PVP、5%的海藻糖、0.05%的Proclin300、0.02%的2-羟基- $\beta$ -环糊精)进行稀释,终浓度分别为40 $\mu$ g/ml、12 $\mu$ g/ml、15 $\mu$ g/ml。

[0107] PLA2R、THSD7A、LF、MPO、PR3、GBM分别用PH9.6的CB缓冲液(3%的PEG4000、2.5%的海藻糖、0.02%的2-羟基- $\beta$ -环糊精、0.05%的Proclin300,以及15%的甘油)稀释至浓度8 $\mu$ g/ml、15 $\mu$ g/ml、15 $\mu$ g/ml、11 $\mu$ g/ml、12 $\mu$ g/ml、20 $\mu$ g/ml。

[0108] LAMP-2、PT蛋白和内皮细胞分别用PH8.5的0.02M的Tris缓冲液(其中含2.5%的PEG4000、0.05%的Proclin300,3%的海藻糖,以及0.01%的2-羟基- $\beta$ -环糊精和15%的甘油)进行稀释,终浓度分别为:20 $\mu$ g/ml、40 $\mu$ g/ml和30 $\mu$ g/ml。

[0109] 所有按照上述稀释好的抗体或抗原分别用0.22 $\mu$ m的滤膜过滤,然后通过BioDot精密点样仪按照要求进行阵列的包被,包被体积为每个点10nL。全部蛋白包被完成之后,将芯片用膜盖住,置于2-8 $^{\circ}$ C,过夜包被24-30h。

[0110] 2、封闭

[0111] 取出包被好的芯片,用PH7.4的PBST洗涤液清洗3次,然后每孔加入150 $\mu$ l的封闭液(1%-2%BSA(g/v),1%-1.5%的柠檬酸(v/v),0.3%-0.6%的甘露醇(v/v),另外还添加了0.8%-1.5%的PVA2W(v/v)和0.05%(v/v)的Proclin300的0.01M的磷酸氢二钠溶液,添加闲情见如表3所示),室温静置封闭35min,然后拍干,于湿度<15%,RT放置干燥4h,后密封、2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0112] 表3

组别	实施例1	实施例2	实施例3
BSA(g/v)	1%	2%	1.5%
柠檬酸(v/v)	1%	1.5%	1.3%
甘露醇(v/v)	0.5%	0.3%	0.6%
PVA2W(v/v)	1%	0.8%	1.5%
Proclin300(v/v)	0.05%	0.05%	0.05%
磷酸氢二钠溶液	0.01M	0.01M	0.01M

[0114] 3、制备酶标试剂

[0115] 用pH值为7.4的酶标稳定缓冲液(0.01M PBS,0.05M的柠檬酸、1.5%-2.5%的BSA(g/v)、1.5%-2%的PEG1W(v/v)、0.1%-0.2%的阿拉伯树胶(g/v)、0.2%-0.5%的对羟基苯甲酸钠(v/v)以及0.05%的Proclin300(v/v),添加详情见表4)将HRP标记的兔抗人IgG稀

释至4K倍(4000倍),混匀。

[0116] 表4

[0117]

组别	实施例1	实施例2	实施例3
柠檬酸	1%	1.5%	1.3%
BSA (g/v)	2%	1.5%	2.5%
PEG1W (v/v)	2%	1.5%	1.8%
阿拉伯树胶 (g/v)	0.1%	0.2%	0.15%
对羟基苯甲酸钠 (v/v)	0.3%	0.5%	0.2%
Proclin300 (v/v)	0.05%	0.05%	0.05%
PBS溶液	0.01M	0.01M	0.01M

[0118] 4、试剂盒的反应体系

[0119] 1) 取出芯片试剂,平衡至室温;

[0120] 2) 加样:将阴性和阳性对照血清、以及用样品稀释液(0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05%Tween20,0.01%酪蛋白,PH7.4)稀释了101倍的待测样品,每孔100uL加入待测芯片孔中反应。

[0121] 3) 温育:室温反应30min。加300uL洗涤液(0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05% Tween20,PH7.4),洗涤3次,每次1min。

[0122] 4) 加酶标试剂:每孔加入100uL的酶标记物(兔抗人HRP);

[0123] 5) 温育:室温反应30min。加300uL洗涤液,洗涤3次,每次1min。

[0124] 6) 显色:每孔加入ECL显色剂50uL,室温避光反应30min,之后吸干。

[0125] 7) 检测:30min内,通过伯劳特化学发光芯片分析仪读取并分析每个反应孔对应检测指标的信号值,通过S1-S3参考点校准的标准曲线,来计算并判断结果的阴阳性及强度。

[0126] 实施例4准确性评价

[0127] 1、用Abnova公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗GBM IgG阳性血清和10例抗GBM IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片试剂盒进行测试,结果如下表5(+表示阳性,-表示阴性)。

[0128] 表5实施例1~3制备的芯片测试抗GBM IgG血清结果

[0129]

组别	ELISA试剂盒确定 抗GBM IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗GBM IgG阴性血清									
实施例1制得的芯片GBM测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片GBM测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片GBM测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0130] 2、用EUROIMMUN公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗PR3 IgG阳性血清和10例抗PR3 IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片测试,结果如下表6(+表示阳性,-表示阴性)。

[0131] 表6实施例1~3制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试抗PR3 IgG血清结果

[0132]

组别	ELISA试剂盒确定 抗PR3 IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗PR3 IgG阴性血清									
实施例1制得的芯片PR3测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片PR3测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片PR3测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0133] 3、用Invitrogen公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗MPO IgG阳性血清和10例抗

MPO IgG阴性血清,实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表7(+表示阳性,-表示阴性)。

[0134] 表7实施例1~3制备的芯片测试抗MPO IgG血清结果

组别	ELISA试剂盒确定 抗MPO IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗MPO IgG阴性血清									
[0135] 实施例1制得的芯片MPO测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片MPO测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片MPO测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0136] 4、用cusbio公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗LF IgG阳性血清和10例抗LF IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片测试,结果如下表8(+表示阳性,-表示阴性)。

[0137] 表8实施例1~3制备的芯片测试抗LF IgG血清结果

组别	ELISA试剂盒确定 抗LF IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗LF IgG阴性血清									
[0138] 实施例1制得的芯片LF测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片LF测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片LF测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0139] 5、用biorbyt公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗LAMP-2 IgG阳性血清和10例抗LAMP-2 IgG阴性血清,实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表9(+表示阳性,-表示阴性)。

[0140] 表9实施例1~3制备的芯片测试抗LAMP-2 IgG血清结果

组别	ELISA试剂盒确定 抗LAMP-2 IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗LAMP-2 IgG阴性血清									
[0141] 实施例1制得的芯片LAMP-2测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片LAMP-2测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片LAMP-2测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0142] 6、用EUROIMMUN公司ELISA试剂盒筛选的10例确定感染抗PLA2R IgG阳性血清和10例抗PLA2RIgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表10(+表示阳性,-表示阴性)。

[0143] 表10实施例1~3制备的芯片测试抗PLA2R IgG血清结果

组别	ELISA试剂盒确定 抗PLA2R IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗PLA2R IgG阴性血清									
[0144] 实施例1制得的芯片PLA2R测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片PLA2R测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片PLA2R测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0145] 7、用EUROIMMUN公司试剂盒(间接免疫荧光法)筛选的10例确定抗THSD7A IgG阳性血清和10例抗THSD7A IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表11(+表示阳性,-表示阴性)。

[0146] 表11实施例1~3制备的芯片测试抗THSD7A IgG血清结果

[0147]

组别	EUROIMMUN试剂盒确定 抗THSD7A IgG阳性血清										EUROIMMUN试剂盒确定 抗THSD7A IgG阴性血清									
	实施例1制得的芯片THSD7A测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片THSD7A测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片THSD7A测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0148] 8、同时用EUROIMMUN公司ELISA试剂盒与EUROIMMUN司试剂盒(间接免疫荧光法)两种筛选的10例确定抗PT蛋白IgG阳性血清和10例抗PT蛋白IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表12(+表示阳性,-表示阴性)。(PT蛋白抗体是本公司研究制备的抗磷脂酶A2受体(PLA2R)与1型血小板反应蛋白7A域(THSD7A)融合的融合蛋白PT蛋白抗体)。

[0149] 表12实施例1~3制备的芯片测试抗PT蛋白IgG血清结果

[0150]

组别	EUROIMMUN试剂盒确定 抗PT蛋白 IgG阳性血清										EUROIMMUN试剂盒确定 抗PT蛋白 IgG阴性血清									
	实施例1制得的芯片PT蛋白测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片PT蛋白测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片PT蛋白测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0151] 9、用cusabio公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗内皮细胞抗体IgG阳性血清和10例抗内皮细胞抗体IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表13(+表示阳性,-表示阴性)。

[0152] 表13实施例1~3制备的芯片测试抗内皮细胞抗体IgG血清结果

[0153]

组别	ELISA试剂盒确定 抗内皮细胞 IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗内皮细胞 IgG阴性血清									
	实施例1制得的芯片内皮细胞测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片内皮细胞测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片内皮细胞测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0154] 10、用CD公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗C1q IgG阳性血清和10例抗C1qIgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表14(+表示阳性,-表示阴性)。

[0155] 表14实施例1~3制备的芯片测试抗C1q IgG血清结果

[0156]

组别	ELISA试剂盒确定 抗C1q IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗C1q IgG阴性血清									
	实施例1制得的芯片C1q测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片C1q测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片C1q测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0157] 11、用Abcam公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗dsDNA IgG阳性血清和10例抗dsDNA IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表15(+表示阳性,-表示阴性)。

[0158] 表15实施例1~3制备的芯片测试抗dsDNA IgG血清结果

组别	ELISA试剂盒确定 抗dsDNA IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗dsDNA IgG阴性血清									
	[0159] 实施例1制得的芯片dsDNA测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片dsDNA测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片dsDNA测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0160] 12、用NOVATEINBIO公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗核小体IgG阳性血清和10例抗核小体IgG阴性血清,用实施例1~3制备的芯片进行测试,结果如下表16(+表示阳性,-表示阴性)。

[0161] 表16实施例1~3制备的芯片测试抗核小体IgG血清结果

组别	ELISA试剂盒确定 抗核小体 IgG阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗核小体 IgG阴性血清									
	[0162] 实施例1制得的芯片核小体测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例2制得的芯片核小体测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
实施例3制得的芯片核小体测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0163] 综上所述,本发明制备的芯片测试各项自身免疫性肾病相关抗原IgG的准确性符合要求,准确性高。

[0164] 实施例5敏感性和特异性试验结果

[0165] 患者样本是通过肾穿刺和临床表现共同确诊为自免肾病患者的阳性血清样本85例,正常健康人的阴性血清样本102例。

[0166] 表17

检测结果		n	一致的例数	一致率分母	一致率 (%)
临床诊断为自 免肾病	本发明的芯 片试剂盒				
+	+	84	84	85	98.8%
+	-	1			
-	+	0	102	102	100%
-	-	102			
合计		187	186	187	99.46%

[0168] 以上数据可以看出,本发明的芯片试剂盒对临床上自免肾病患者(通过肾穿刺和临床症状共同确诊的自免肾病患者)检测的敏感度(阳性符合率)可达98.8%,特异性(阴性正确率)达100%,说明本发明的试剂盒敏感度高,特异性好,对自免肾病的诊断可提供更为准确和全面的参考和指导。

[0169] 实施例6试剂盒的稳定性实验结果

[0170] 自免肾病相关抗体谱芯片试剂盒的稳定性实验结果:

[0171] 表18

[0172]

2-8 °C	对应 抗原	0 个 月	6 个 月	6个月/0 个月	12 个 月	12 个 月/0 个月	12 个 月/6 个月	18 个 月	18 个 月/0 个月	18 个 月/6 个月	18 个 月/12 个月	24 个 月	24 个 月/0 个月	24 个 月/6 个月	24 个 月/12 个月	24 个 月/18 个月
检测 结果 信号 值	GBM	213 05	206 75	97.04%	202 67	95.1 3%	98.0 3%	200 11	93.9 3%	96.7 9%	98.7 4%	195 61	91.8 1%	94.6 1%	96.5 2%	97.7 5%
	PR3	998 6	962 1	96.34%	958 9	96.0 2%	99.6 7%	935 1	93.6 4%	97.1 9%	97.5 2%	916 2	91.7 5%	95.2 3%	95.5 5%	97.9 8%
	MPO	155 47	149 64	96.25%	150 21	96.6 2%	100. 38%	142 62	91.7 3%	95.3 1%	94.9 5%	140 83	90.5 8%	94.1 1%	93.7 6%	98.7 4%
	LF	826 9	800 8	96.84%	796 3	96.3 0%	99.4 4%	766 5	92.7 0%	95.7 2%	96.2 6%	752 1	90.9 5%	93.9 2%	94.4 5%	98.1 2%
	LAM P-2	138 33	136 24	98.49%	134 11	96.9 5%	98.4 4%	130 24	94.1 5%	95.6 0%	97.1 1%	128 68	93.0 2%	94.4 5%	95.9 5%	98.8 0%
	PLA 2R	394 18	395 12	100.24 %	389 73	98.8 7%	98.6 4%	380 55	96.5 4%	96.3 1%	97.6 4%	367 42	93.2 1%	92.9 9%	94.2 8%	96.5 5%
	THS D7A	266 31	260 42	97.79%	258 89	97.2 1%	99.4 1%	251 39	94.4 0%	96.5 3%	97.1 0%	245 18	92.0 7%	94.1 5%	94.7 0%	97.5 3%
	PT蛋	364	363	99.65%	358	98.3	98.7	349	95.9	96.2	97.5	340	93.3	93.6	94.9	97.3

[0173]

白	47	19		46	5%	0%	67	4%	8%	5%	26	6%	9%	2%	1%
内皮 细胞	188 65	186 94	99.09%	184 75	97.9 3%	98.8 3%	180 36	95.6 1%	96.4 8%	97.6 2%	175 57	93.0 7%	93.9 2%	95.0 3%	97.3 4%
核小 体	921 8	906 9	98.38%	884 2	95.9 2%	97.5 0%	867 5	94.1 1%	95.6 6%	98.1 1%	842 4	91.3 9%	92.8 9%	95.2 7%	97.1 1%
dsDN A	266 58	265 72	99.68%	256 58	96.2 5%	96.5 6%	251 16	94.2 2%	94.5 2%	97.8 9%	246 31	92.4 0%	92.7 0%	96.0 0%	98.0 7%
Clq	163 77	161 05	98.34%	158 26	96.6 4%	98.2 7%	152 64	93.2 0%	94.7 8%	96.4 5%	149 97	91.5 7%	93.1 2%	94.7 6%	98.2 5%

[0174] 2-8°C稳定期可达2年。

[0175] 表19

[0176]

18-28°C	对应抗原	0	3	3个	6	6个	6个	9	9个	9个	9个	12	12	12	12	
		个月	个月	个月/0个月	个月	个月/0个月	个月/3个月	个月	个月/0个月	个月/3个月	个月/6个月	个月	个月/0个月	个月/3个月	个月/6个月	个月/9个月
检测 结果 信号 值	GBM	213 05	206 22	96.7 9%	201 52	94.5 9%	97.7 2%	192 91	90.5 5%	93.5 5%	95.7 3%	180 16	84.5 6%	87.3 6%	89.4 0%	93.3 9%
	PR3	998 6	963 3	96.4 7%	931 8	93.3 1%	96.7 3%	906 4	90.7 7%	94.0 9%	97.2 7%	811 5	81.2 6%	84.2 4%	87.0 9%	89.5 3%
	MPO	155 47	147 69	95.0 0%	143 05	92.0 1%	96.8 6%	140 21	90.1 8%	94.9 4%	98.0 1%	121 98	78.4 6%	82.5 9%	85.2 7%	87.0 0%
	LF	826 9	795 1	96.1 5%	763 8	92.3 7%	96.0 6%	755 3	91.3 4%	94.9 9%	98.8 9%	602 4	72.8 5%	75.7 6%	78.8 7%	79.7 6%
	LAM	138	134	97.0	130	94.4	97.3	126	91.2	94.0	96.6	108	78.5	80.9	83.1	86.0
	P-2	33	25	5%	68	7%	4%	25	7%	4%	1%	62	2%	1%	2%	4%
	PLA2	394	385	97.8	378	96.0	98.1	361	91.8	93.8	95.5	330	83.8	85.7	87.3	91.3
	R	18	65	4%	57	4%	6%	85	0%	3%	8%	50	4%	0%	0%	4%
THS	266	259	97.3	249	93.8	96.3	246	92.6	95.1	98.7	206	77.6	79.7	82.7	83.8	

[0177]

D7A	31	31	7%	96	6%	9%	70	4%	4%	0%	85	7%	7%	5%	5%
PT 蛋 白	364 47	359 26	98.5 7%	342 01	93.8 4%	95.2 0%	339 51	93.1 5%	94.5 0%	99.2 7%	286 28	78.5 5%	79.6 9%	83.7 1%	84.3 2%
内皮 细胞	188 65	185 82	98.5 0%	179 46	95.1 3%	96.5 8%	171 60	90.9 6%	92.3 5%	95.6 2%	152 90	81.0 5%	82.2 8%	85.2 0%	89.1 0%
核小 体	921 8	891 5	96.7 1%	862 3	93.5 5%	96.7 2%	826 8	89.6 9%	92.7 4%	95.8 8%	601 8	65.2 9%	67.5 0%	69.7 9%	72.7 9%
dsDN A	266 58	257 64	96.6 5%	250 33	93.9 0%	97.1 6%	241 28	90.5 1%	93.6 5%	96.3 8%	225 48	84.5 8%	87.5 2%	90.0 7%	93.4 5%
Clq	163 77	159 66	97.4 9%	151 18	92.3 1%	94.6 9%	146 55	89.4 9%	91.7 9%	96.9 4%	134 63	82.2 1%	84.3 2%	89.0 5%	91.8 7%

[0178] 18-28°C稳定期9个月。

[0179] 实施例7

[0180] 对比试剂盒：(一般封闭液和酶标稀释液的成分：0.01M PBS (PH7.4) +10%BSA)。

[0181] 表20

[0182]

2-8°C	对应抗原	本发明的芯片试剂 盒检测信号值	一般封闭液和酶标 稀释液的对比试剂 盒	两种试剂盒检测的信号值百 分比
6 个月	GBM	20675	20230	97.85%
	PR3	9621	9472	98.45%
	MPO	14964	14905	99.61%
	LF	8008	7968	99.50%
	LAMP-2	13624	13258	97.31%
	PLA2R	39512	39478	99.91%
	THSD7A	26042	25965	99.70%

[0183]

	PT 蛋白	36319	36295	99.93%
	内皮细胞	18694	18688	99.97%
	核小体	9069	9046	99.75%
	dsDNA	26572	26575	100.01%
	C1q	16105	16072	99.80%
12 个月	GBM	20267	20167	99.51%
	PR3	9589	9460	98.65%
	MPO	15021	14684	97.76%
	LF	7963	7896	99.16%
	LAMP-2	13411	13265	98.91%
	PLA2R	38973	38796	99.55%
	THSD7A	25889	25648	99.07%
	PT 蛋白	35846	35626	99.39%
	内皮细胞	18475	18291	99.00%
	核小体	8842	8715	98.56%
	dsDNA	25658	25460	99.23%
	C1q	15826	15666	98.99%
18 个月	GBM	20011	15650	78.21%
	PR3	9351	6086	65.08%
	MPO	14262	9663	67.75%
	LF	7665	5016	65.44%
	LAMP-2	13024	6651	51.07%
	PLA2R	38055	28644	75.27%
	THSD7A	25139	15113	60.12%
	PT 蛋白	34967	26725	76.43%
	内皮细胞	18036	13263	73.54%
	核小体	8675	6015	69.34%
	dsDNA	25116	18165	72.32%
	C1q	15264	10460	68.53%

[0184]

24 个月	GBM	19561	958	4.90%
	PR3	9162	415	4.53%
	MPO	14083	858	6.09%
	LF	7521	362	4.81%
	LAMP-2	12868	1056	8.21%
	PLA2R	37242	1124	3.02%
	THSD7A	24918	848	3.40%
	PT 蛋白	34126	968	2.84%
	内皮细胞	17557	556	3.17%
	核小体	8424	269	3.19%
	dsDNA	24631	875	3.55%
	C1q	14997	341	2.27%

[0185] 表21

[0186]

18-28°C	对应抗原	本发明的芯片试剂盒 检测信号值	一般封闭液和酶标稀释 液的对比试剂盒	两种试剂盒检测的信 号值百分比
3 个月	GBM	20622	19985	96.91%
	PR3	9633	9135	94.83%
	MPO	14769	14136	95.71%
	LF	7951	7608	95.69%
	LAMP-2	13425	13018	96.97%
	PLA2R	38565	37126	96.27%
	THSD7A	25931	24428	94.20%
	PT 蛋白	35926	34461	95.92%
	内皮细胞	18582	18062	97.20%
	核小体	8915	8364	93.82%
	dsDNA	25764	24951	96.84%

	C1q	15966	15147	94.87%	
[0187]	6 个月	GBM	20152	15216	75.51%
		PR3	9318	6788	72.85%
		MPO	14305	9965	69.66%
		LF	7638	5866	76.80%
		LAMP-2	13068	10286	78.71%
		PLA2R	37857	20122	53.15%
		THSD7A	24996	15560	62.25%
		PT 蛋白	34201	21461	62.75%
		内皮细胞	17946	11368	63.35%
		核小体	8623	5475	63.49%
		dsDNA	25033	16412	65.56%
		C1q	15118	9915	65.58%
		9 个月	GBM	19291	1036
PR3	9064		643	7.09%	
MPO	14021		582	4.15%	
LF	7553		622	8.24%	
LAMP-2	12625		431	3.41%	
PLA2R	36185		1505	4.16%	
THSD7A	24670		1088	4.41%	
PT 蛋白	33951		1264	3.72%	
内皮细胞	17160		676	3.94%	
核小体	8268		328	3.97%	
dsDNA	24128		775	3.21%	
C1q	14655		460	3.14%	

[0188] 上述试验采用的是本发明的试剂盒与用了一般的封闭液和酶标稀释液的试剂盒(其余条件一样)做实验对比,结果本发明的试剂盒的稳定效果要优于使用了一般封闭液和酶标稀释液的普通试剂盒。

[0189] 数据显示,本发明的试剂盒测试的稳定性在2-8℃能储存2年,室温(18-28℃能放置9个月),证明其稳定性较好。同时与现有技术中使用的封闭液和酶标稀释液做比较,也是本发明的试剂盒稳定性更优。

[0190] 实施例8

[0191] 按实施例1-3制备试剂盒与制备常规ELISA试剂盒抗原用量比较:

[0192] 表22

每人份试剂盒抗原用量比对								
按实施例 1-3 制备试剂盒抗原用量			制备常规 ELISA 试剂盒抗原用量					
项目	抗原稀释浓度	加样体积	抗原用量	抗原稀释浓度	加样体积	抗原用量		
dsDNA	40µg/ml	10 nL	0.0004µg	1µg/ml	100ul	0.1µg		
核小体	12µg/ml		0.00012µg			0.1µg		
C1q	15µg/ml		0.00015µg			0.1µg		
PLA2R	8µg/ml		0.00008µg			0.1µg		
THSD7A	15µg/ml		0.00015µg			0.1µg		
LF	15µg/ml		0.00015µg			0.1µg		
MPO	11µg/ml		0.00011µg			0.1µg		
PR3	12µg/ml		0.00012µg			0.1µg		
GBM	20µg/ml		0.0002µg			0.1µg		
LAMP-2	20µg/ml		0.0002µg			0.1µg		
PT 蛋白	40µg/ml		0.0004µg			0.1µg		
内皮细胞	30µg/ml		0.0003µg			0.1µg		
总计	0.00238µg		1.2µg					

[0194] 综上所述,表明本发明提供的试剂盒能有效的减少相关抗原的使用量,在保证试剂盒的灵敏性和特异性的同时,降低相关的抗原使用成本。

[0195] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。