



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110716054 A

(43)申请公布日 2020.01.21

(21)申请号 201910859182.0

(22)申请日 2019.09.11

(71)申请人 天津医科大学

地址 300203 天津市和平区气象台路22号

(72)发明人 李会强 余钿田 于洋 李军普

崔亚琼 黄伦辉 李柳棚 张蓓

(74)专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理
有限公司 12211

代理人 刘莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

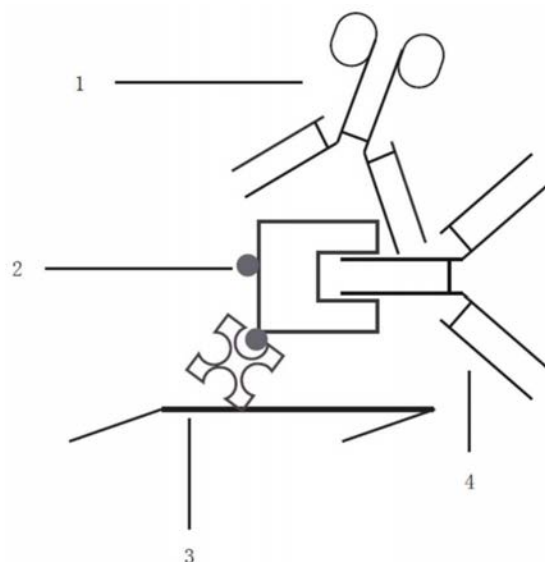
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测
试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,包括如下试剂,亲合素预包被酶标反应板、生物素标记重组人Fc ϵ RI- α 亚基、酶标记抗体;本发明基于受体-待检IgE分子-抗IgE抗体分析模式,利用受体作为捕获分子,能够捕获具有亲细胞活性IgE分子,从而致使检测结果具有生物活性的意义,更好指导临床的诊断和治疗。



1. 重组人FcεRI-α亚基在血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒中的应用。
2. 一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,其特征在于:包括如下试剂,亲合素预包被酶标反应板、生物素标记重组人FcεRI-α亚基、酶标记抗体。
3. 根据权利要求2所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,其特征在于:所述生物素标记重组人FcεRI-α亚基为能结合血清亲细胞性免疫球蛋白E。
4. 根据权利要求2所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,其特征在于:所述酶标记抗体为辣根过氧化物酶标记羊抗人IgE多克隆抗体。
5. 根据权利要求2所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,其特征在于:还包括酶底物、终止液以及洗液。
6. 根据权利要求5所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,其特征在于:所述酶底物为TMB-H₂O₂溶液;终止液为稀硫酸溶液;洗液为PBS溶液与Tween-20溶液。
7. 如权利要求2~6任一项所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒在制备亲细胞性IgE水平检测试剂中的应用。
8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,包括以下步骤:
 - 1) 加入生物素标记重组人FcεRI-α亚基(终浓度0.8~1.2微克/毫升,优选的,终浓度1微克/毫升)至微孔板,50微升/孔,同时加入校准品溶液,或待检样本,50微升/孔;
 - 2) 混匀,37℃,水浴0.8~1.2小时,优选的,水浴1小时;
 - 3) 用洗液,洗板机洗涤4~6次,甩干孔内液体,优选的,洗涤5次;
 - 4) 加入辣根过氧化物酶标记羊抗人IgE多克隆抗体(HRP-anti-hIgE)(稀释比例,1:5000)于孔内,100微升/孔;
 - 5) 混匀,37℃,水浴0.8~1.2小时,优选的,水浴1小时;
 - 6) 重复“3”;
 - 7) 加入双组分TMB显色液:加底物显色液A、显色液B各50微升/孔(或A、B液先混合再加入孔中,100微升/孔),轻轻混匀,在室温(22~25℃)或37℃下避光温育10~15分钟,直至显色至预期深浅;
 - 8) 加入终止液至孔内终止反应,50微升/孔,蓝色变为黄色;
 - 9) 使用酶标仪于30分钟内在450nm处测定吸光值。

一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于血清免疫球蛋白E (IgE) 分析技术领域,尤其是涉及一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒及方法,具体指能够与肥大细胞或嗜碱性粒细胞结合的、具有亲细胞活性的IgE (Cyto-IgE) 蛋白水平的定量分析。

背景技术

[0002] 在正常情况下,人体免疫系统对病原体发生免疫应答,诱导机体产生对病原体的抵抗能力,从而保护机体免受感染性疾病的困扰。但是,在异常情况下,某些特殊个体对吸入性物质(如花粉)或食入性食物(如牛奶),产生不利于人体健康的免疫应答,导致人体不适,如皮疹、哮喘、肠胃炎、甚至过敏性休克危及生命,临床称之为“变态反应性疾病”。临床绝大多数变态反应性疾病的发生机制是由免疫球蛋白E (IgE) 类抗体介导的,肥大细胞或嗜碱性粒细胞参与。免疫球蛋白E抗体 (IgE) 具有亲细胞性,其Fc段与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面受体 (FcεR) 结合,致使肥大细胞或嗜碱性粒细胞致敏。处于致敏状态的细胞,如遇到相应过敏原物质,位于细胞表面的IgE抗体通过可变区 (VH/VL) 结合相应抗原表位,形成“抗原桥”产生级联反应,致使细胞脱颗粒释放生物活性介质,活性介质作用于靶组织或器官导致临床症状。

[0003] 变态反应性疾病的临床诊断主要依靠病史和过敏原确认,而血清IgE定量分析同样是临床诊断的重要指标。血清IgE定量分析可作为变态反应性疾病的初筛试验,也可作为过敏性疾病鉴别诊断的重要指标。

[0004] 研究表明,免疫球蛋白E抗体 (IgE) 是介导变态反应性疾病的主要免疫球蛋白。体内IgE部分分布于血清中处于游离状态 (Free-IgE),部分与肥大细胞或嗜碱性粒细胞结合,处于结合状态 (Binding-IgE)。致敏机体再次遇到过敏原,结合状态IgE抗体,与过敏原结合致使变态反应的发生导致临床症状,换言之,结合状态IgE (Binding-IgE) 是直接参与变态反应疾病相关的抗体状态。

[0005] 目前,血清免疫球蛋白E定量检测方法主要包括散射免疫比浊法和发光免疫分析方法。免疫比浊法采用抗人IgE抗体包被的乳胶微球作为主要试剂,与血清中待检IgE结合,造成乳胶微球交联致使散射光发生改变,通过检测散射光强度获得待检血清标本IgE的水平。而在发光免疫分析中,无论是化学发光还是电化学发光,一般采用双抗体夹心模式,即采用一对抗人IgE抗体分别作为捕获抗体(与固相载体连接)和标记抗体(与发光剂偶联),待检IgE分子与两种试剂形成“双抗体夹心”复合物,通过检测标记物信号获得待检血清标本IgE的水平。无论免疫比浊法,还是双抗体夹心法,二者均采用特异性抗体(抗人IgE抗体)作为识别受体,与待检IgE分子结合,即将待检IgE分子视为“蛋白”来检测的,不能反映待检IgE作为功能性分子(结合细胞)来检测的。因此,目前检测方法存在某些缺陷,即不能反映待检IgE抗体在体内的生物活性,从而导致检测结果与临床症状有时存在矛盾的现象。

发明内容

[0006] 基于目前血清IgE抗体检测方法采用免疫化学分析原理,存在不能反映于人体内的亲细胞活性、不能反映体内真实生物活性的不足,本发明基于受体-待检IgE分子-抗IgE抗体分析模式,利用重组人Fc ϵ RI- α 亚基作为捕获分子,能够捕获具有亲细胞活性IgE分子,从而致使检测结果具有生物活性的意义,更好指导临床的诊断和治疗。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0008] 本发明提供重组人Fc ϵ RI- α 亚基在血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒中的应用。

[0009] 本发明同时提供一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,包括如下试剂,亲合素预包被酶标反应板、生物素标记重组人Fc ϵ RI- α 亚基、酶标记抗体。

[0010] 优选的,所述生物素标记重组人Fc ϵ RI- α 亚基为能结合血清亲细胞性免疫球蛋白E。

[0011] 优选的,所述酶标记抗体为辣根过氧化物酶标记羊抗人IgE多克隆抗体。

[0012] 优选的,还包括酶底物、终止液以及洗液。

[0013] 优选的,所述酶底物为TMB-H₂O₂溶液;终止液为稀硫酸溶液;洗液为PBS溶液与Tween-20溶液。

[0014] 本发明还提供了如上所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒在制备亲细胞性IgE水平检测试剂中的应用。

[0015] 优选的,包括以下步骤:

[0016] 1) 加入生物素标记重组人Fc ϵ RI- α 亚基(终浓度0.8-1.2微克/毫升,优选的,终浓度1微克/毫升)至微孔板,50微升/孔,同时加入校准品溶液,或待检样本,50微升/孔;

[0017] 2) 混匀,37℃,水浴1小时;

[0018] 3) 用洗液,洗板机洗涤5次,甩干孔内液体;

[0019] 4) 加入辣根过氧化物酶标记羊抗人IgE多克隆抗体(HRP-anti-hIgE)(稀释比例,1:5000)于孔内,100微升/孔;

[0020] 5) 混匀,37℃,水浴1小时;

[0021] 6) 重复“3”;

[0022] 7) 加入双组分TMB显色液:加底物显色液A、显色液B各50微升/孔(或A、B液先混合再加入孔中,100微升/孔),轻轻混匀,在室温(22-25℃)或37℃下避光温育10-30分钟,直至显色至预期深浅;

[0023] 8) 加入终止液至孔内终止反应,50微升/孔,蓝色变为黄色;

[0024] 9) 使用酶标仪于30分钟内在450nm处测定吸光值。

[0025] 复合物中结合的IgE即为亲细胞性IgE,其量的多少与显色深浅及吸光度值呈正比。

[0026] 本发明创新点是采用重组人Fc ϵ RI- α 亚基(IgE FC受体)作为捕获待检IgE分子的受体,替代传统检测方法中的抗人IgE抗体。此种替代方式,重组人Fc ϵ RI- α 亚基捕获能结合细胞的IgE分子,而那些与细胞结合能力不强的IgE分子则不能被捕获。为此,此种方式只检测具有生物活性的IgE分子,即亲细胞性IgE分子(cytotropism IgE,Cyto-IgE)。

[0027] 相对于现有技术,本发明所述的血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒,具

有以下优势：

[0028] 采用IgE FC受体作为捕获抗体，直接捕获待检血清中亲细胞性IgE分子，亲细胞性IgE分子(Cyto-IgE)是直接导致肥大细胞或嗜碱性粒细胞致敏的免疫球蛋白，此环节是导致临床症状的重要环节。为此，此技术发明的检测方法，能够反映待检IgE分子的亲细胞活性，可部分反映IgE分子的生物学活性，此种生物活性直接关系IgE分子的致病活性。换言之，本发明采用受体-IgE分子结合的原理，达到细胞生物学检测的临床意义。

附图说明

[0029] 图1为本发明的检测原理图；

[0030] 1HRP标记羊抗人-IgE抗体；2生物素标记重组人FcεRI-α亚基(受体)；3预包被链霉亲和素微孔板；4待检IgE分子(Cyto-IgE)

[0031] 图2为本发明实施例一中得到的亲细胞tIgE校准曲线；

[0032] 图3为用常规方法(免疫散射比浊)以及实施例一中得到的结果的相关性，其中R2为0.77；

[0033] 图4为剔除差值较大的标本后，用常规方法(免疫散射比浊)以及实施例一中得到的结果的相关性，其中R2为0.98。

具体实施方式

[0034] 除有定义外，以下实施例中所用的技术术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义。以下实施例中所用的试验试剂，如无特殊说明，均为常规生化试剂；所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

[0035] 下面结合实施例来详细说明本发明。

[0036] 实施例一

[0037] 一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒，主要试剂为：

[0038] 亲和素预包被酶标反应板，品牌：Monobind Inc. 货号：146MM；

[0039] 生物素标记重组人FcεRI-α亚基，重组人FcεRI-α亚基的品牌：Abcam 货号：ab114334；生物素标记试剂盒EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit；按照试剂盒说明书标记重组人FcεRI-α亚基；

[0040] 辣根过氧化物酶标记羊抗人IgE多克隆抗体，品牌：Abcam，货号：ab73901；

[0041] IgE校准品溶液，浓度(IU/ml)为0、50、125、250、500、1000以及3000；

[0042] TMB-H₂O₂溶液(酶底物)，双组分TMB显色液；品牌：Solarbio；货号：PR1210；

[0043] 稀硫酸溶液(终止液)，ELISA终止液，品牌：Solarbio；货号：C1058。

[0044] 洗液，配方：0.02mol/L PBS (pH7.4)+0.05% Tween-20；配制方法：将50ul Tween-20溶入100ml 0.02mol/L磷酸盐缓冲液中，震荡混匀。

[0045] 检测步骤：

[0046] 所有试剂和样本提前取出，室温静置30分钟以上。

[0047] 1) 加入生物素标记IgE FC受体(终浓度1微克/毫升)至微孔板，50微升/孔，同时加入校准品溶液，或待检样本，50微升/孔。

[0048] 2) 混匀，37℃，水浴1小时。

[0049] 3) 用洗涤缓冲液,洗板机洗涤5次,甩干孔内液体。

[0050] 加入辣根过氧化物酶标记羊抗人IgE多克隆抗体 (HRP-anti-hIgE) (稀释比例,1:5000) 于孔内,100微升/孔。

[0051] 4) 混匀,37℃,水浴1小时。

[0052] 5) 重复步骤3)。

[0053] 6) 加入双组分TMB显色液:加底物显色液A、显色液B各50微升/孔(或A、B液先混合再加入孔中,100微升/孔),轻轻混匀,在室温(22-25℃)或37℃下避光温育10-30分钟,直至显色至预期深浅。

[0054] 7) 加入终止液至孔内终止反应,50微升/孔,蓝色变为黄色。

[0055] 8) 使用酶标仪于30分钟内在450nm处测定吸光值。

[0056] 9) 用已知浓度的校准品和相应信号值建立数学模型(校准曲线如图2所示),未知样本的亲细胞性IgE水平通过函数获得。

[0057] 表1标准曲线测定值

[0058]

校准品		OD-1	OD-2	均值
序号	浓度 (IU/ml)			
1	0	0.061	0.059	0.060
2	50	0.131	0.115	0.123
3	125	0.228	0.229	0.229
4	250	0.455	0.452	0.454
5	500	0.791	0.821	0.806
6	1000	1.221	1.189	1.205
7	3000	1.921	1.786	1.854

[0059] 表2为临床样本检测值 单位IU/mL

[0060]

序号	常 规 方 法 测 值	本 方 法 测 值	序号	常 规 方 法 测 值	本 方 法 测 值	序号	常 规 方 法 测 值	本 方 法 测 值
1	6.5	6.3	23	168	199.3	45	468	480.9
2	7.9	11.4	24	174	217.8	46	478	554.1
3	10	3.3	25	175	144.8	47	495	490.8
4	12.2	9.4	26	177	225.3	48	508	571.8
5	32.8	35.1	27	179	238.3	49	513	101.6
6	34.4	29.0	28	203	254.4	50	546	591.8
7	41.2	45.4	29	204	67.2	51	569	254.5
8	41.2	52.9	30	217	210.7	52	644	645.2
9	57	52.3	31	221	272.6	53	680	211.6
10	62.1	76.1	32	237	61.5	54	744	857.4
11	87	111.4	33	242	249.2	55	769	769.8
12	87.4	78.9	34	255	296.8	56	800	774.4

[0061]

13	88.6	90.1	35	268	45.8	57	812	542.7
14	96	80.6	36	269	336.1	58	815	872.3
15	104	108.9	37	278	65.7	59	828	855.0
16	115	121.9	38	284	386.9	60	1060	997.0
17	120	175.8	39	324	357.3	61	1070	1055.2
18	131	115.7	40	338	328.5	62	1070	321.3
19	143	164.3	41	349	573.8	63	1260	984.6
20	148	111.6	42	375	471.1	64	1750	349.8
21	154	193.5	43	414	375.9	65	2930	2752.1
22	166	190.3	44	419	396.3			

[0062] 用常规方法(免疫散射比浊)以及实施例一中得到的结果的相关性如图3所示,其中 R^2 为0.77;本实施例提供结果与常规方法(免疫散射比浊)并不一致,部分标本(序号为29,32,35,37,49,51,53,57,62,64)测值显著低于临床测值,说明此类标本中有些IgE并不与受体结合。验证本发明中,利用受体作为捕获分子,能够捕获具有亲细胞活性IgE分子,从而致使检测结果具有生物活性的意义,更好指导临床的诊断和治疗。

[0063] 如剔除差值较大的标本(29,32,35,37,49,51,53,57,62,64)累计十个标本,重新

计算两种方法的相关性。相关系数可提升至 R^2 为0.98。显示较好的相关性(图4所示)。也可说明这些患者中的IgE,含有不结合受体的IgE分子。

[0064] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

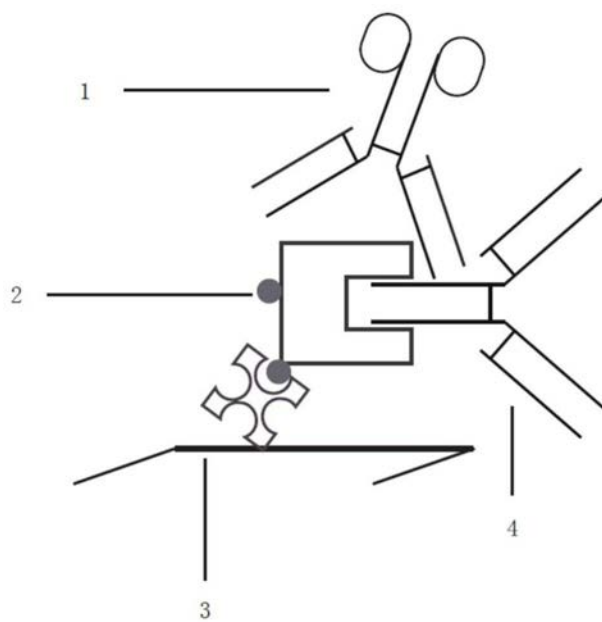


图1

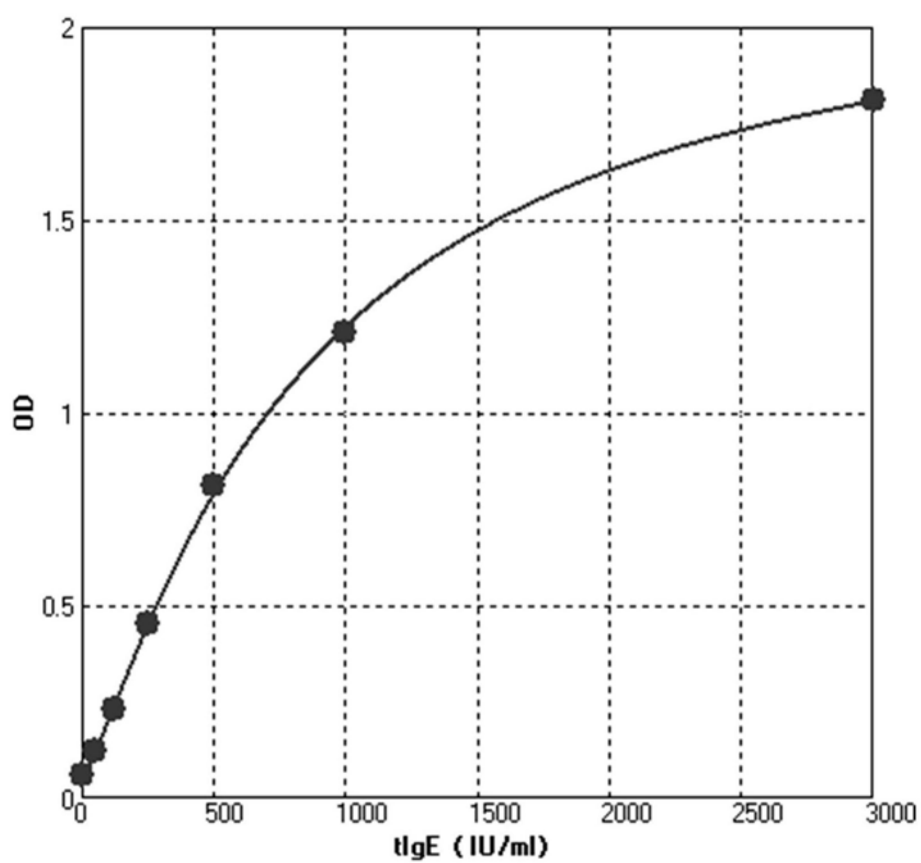


图2

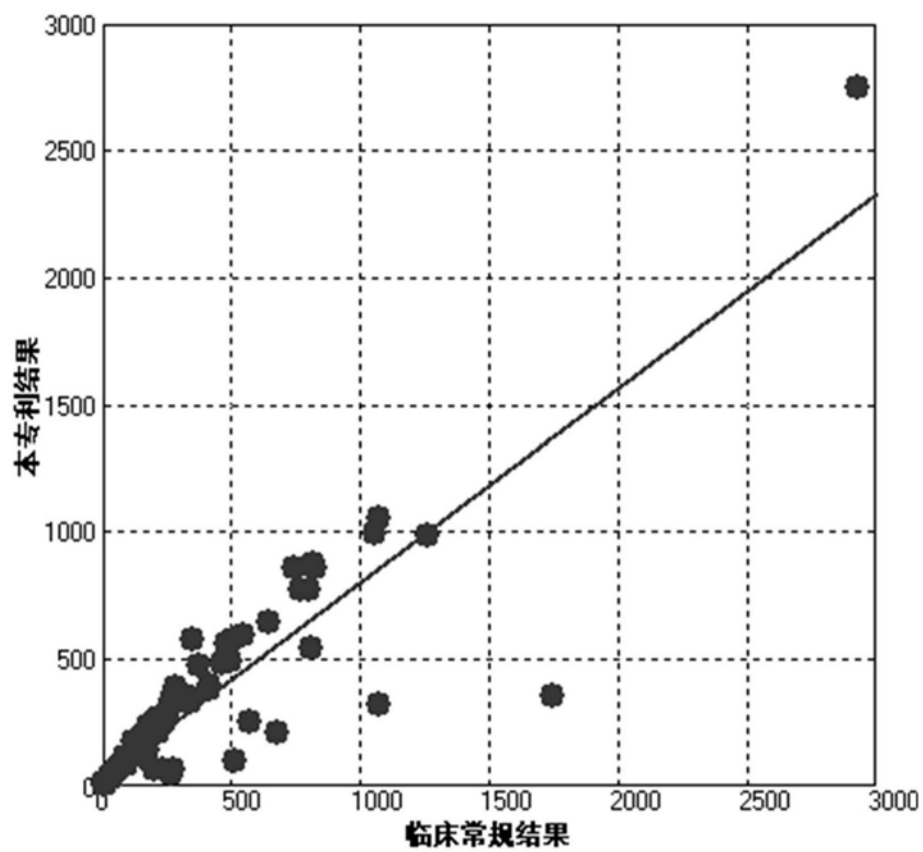


图3

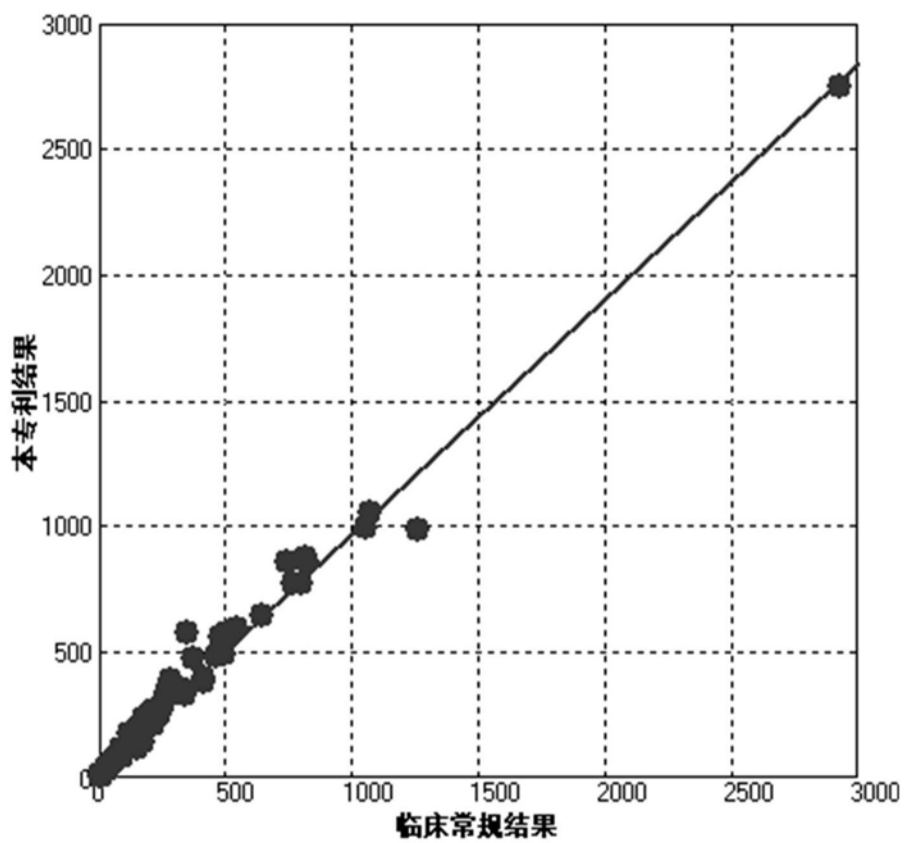


图4

专利名称(译)	一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110716054A	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201910859182.0	申请日	2019-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
[标]发明人	李会强 余钿田 于洋 李军普 崔亚琼 张蓓		
发明人	李会强 余钿田 于洋 李军普 崔亚琼 黄伦辉 李柳栩 张蓓		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/581 G01N33/6854		
代理人(译)	刘莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种血清亲细胞性免疫球蛋白E的定量检测试剂盒，包括如下试剂，亲合素预包被酶标反应板、生物素标记重组人FcεRI-α亚基、酶标记抗体；本发明基于受体-待检IgE分子-抗IgE抗体分析模式，利用受体作为捕获分子，能够捕获具有亲细胞活性IgE分子，从而致使检测结果具有生物活性的意义，更好指导临床的诊断和治疗。

