



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110297093 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910205576.4

(22)申请日 2019.03.18

(71)申请人 山西瑞豪生物科技有限公司

地址 030025 山西省太原市晋源区果树场
南晋祠路三段579号

(72)发明人 王敏兰 牛林茹 陈婷婷 张旋旋
奚瑞芳 阎婧 杨武

(74)专利代理机构 天津欣达睿诚知识产权代理
事务所(普通合伙) 12216

代理人 李欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

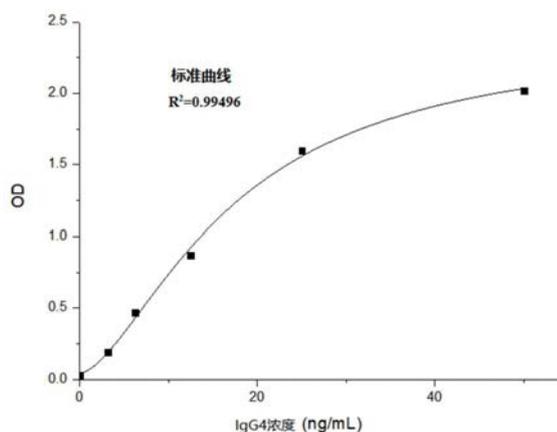
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54)发明名称

一种检测人免疫球蛋白G4的方法和试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种检测人免疫球蛋白G4的方法和试剂盒,属于医学检验技术领域。一种检测样本中人免疫球蛋白G4(IgG4)的方法,使用了两个高特异性抗IgG4Fc片段的单克隆抗体,第一个对IgG4特异的单克隆抗体与固相载体结合,第二个对IgG4特异的单克隆抗体被一种过氧化酶标记。通过与待测样本中IgG4的桥联作用形成第一IgG4单克隆抗体-IgG4-酶标第二IgG4单克隆抗体的复合物并固定与固相载体上。本发明采用高效清洗液去除样本中非特异性干扰物质成分。本发明对生物样本IgG4含量的检测方法实现了对生物样本中IgG4定量检测的高稳定性和高特异性,并准确定量待测物IgG4在人生物样本中的浓度。



1. 一种检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法, 其特征在于: 使用两个高特异性抗IgG4Fc片段的单克隆抗体, 第一个对IgG4特异的单克隆抗体与固相载体结合, 该抗体为第一IgG4单克隆抗体, 第二个对IgG4特异的单克隆抗体被一种过氧化物酶标记, 该抗体为第二IgG4单克隆抗体; 第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体均与检测样本中存在的IgG4结合, 形成第一IgG4单克隆抗体-IgG4-酶标第二IgG4单克隆抗体的复合物并固定于固相载体上; 第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体对IgG4的结合不构成竞争, 且由于两个对IgG4特异结合的单克隆抗体均结合于IgG4分子的Fc段而具有高稳定性; 固相载体上的第一IgG4单克隆抗体与被检测样本中的IgG4结合呈现剂量相关性, 被结合的IgG4依然保持与过氧化物酶标记的第二IgG4单克隆抗体的结合, 并根据被结合的IgG4的量决定氧化标记的第二IgG4单克隆抗体的量, 由第二IgG4单克隆抗体标记的过氧化物酶与酶底物的生色反应定量被测样本中存在的IgG4。

2. 根据权利要求1所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法, 其特征在于: 第一IgG4单克隆抗体是英国抗体试剂公司生产的抗人IgG4重链单克隆抗体 (Abcam, ab1930); 第二IgG4单克隆抗体为Abcam公司生产的IgG4Fc段酶标记单克隆抗体 (Abcam, ab99817)。

3. 根据权利要求1或2所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法, 其特征在于包括如下步骤:

1) 处理待测样本: 以体积比1:10000稀释待检测样品, 取10 μ L样品加入到1mL样品稀释液中, 震荡混匀, 从其中取10 μ L加入到1mL样品稀释液中, 震荡混匀;

2) 加样: 向包被有第一IgG4单克隆抗体的固相载体容器中加入不同浓度的IgG4标准品溶液和稀释的待测样本, 100 μ L/孔, 用封板膜封板后置20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C室温静置30分钟, 使其与固定在固相载体容器上的第一IgG4单克隆抗体Fc片段结合;

3) 洗涤: 清洗去除固相载体容器中未结合的样本成分, 每次每孔加入300 μ L高效清洗液, 清洗4-6次, 在吸水纸上拍干;

4) 加酶标二抗: 向固相载体容器中加入高特异性的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的第二IgG4单克隆抗体溶液, 每孔加入100 μ L, 用封板膜封板后置20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C室温静置30分钟, 使酶标记的第二IgG4单克隆抗体与待测样本中的IgG4结合, 从而使酶标第二IgG4单克隆抗体固定在微孔板上;

5) 洗涤: 清除固相载体中未结合的酶标第二IgG4单克隆抗体, 每次每孔加入300 μ L高效清洗液, 清洗4-6次, 在吸水纸上拍干;

6) 显色: 向固相载体容器中加入TMB (四甲基联苯胺) 显色, 将显色A液和B液按1:1比例混匀, 每孔加入100 μ L, 室温避光轻震15分钟; TMB在HRP酶的催化下形成蓝色的阳离子产物;

7) 终止: 向固相载体容器中每孔加入终止液50 μ L, 轻震混匀以终止反应, 蓝色溶液转变为黄色; 在单波长450nm或双波长450/630nm下依序测量各孔的OD值用分光光度计测定有色溶液的OD值;

8) 通过标准曲线法测定待测样本中IgG4的值:

A. 绘制标准曲线: 计算每个浓度标准品双复孔OD值的平均值, 以标准品的浓度 (ng/mL) 为横坐标, 对应的OD值为纵坐标, 使用数据分析软件 (Origin8) 绘制标准曲线;

B. 结果判断: 根据正常人群IgG4样本浓度均值+3SD为阳性判断值 (cut-off值, 0.212g/L), 对 ≥ 0.212 g/L的样本判定为阳性样本; < 0.212 g/L判定为阴性样本。检测值在0.173g/L

L-0.212g/L范围内提示接近阳性判定值,建议复测。

4. 根据权利要求3所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法,其特征在于:

所述固相载体容器为96孔或48孔聚苯乙烯酶标板;所述待测样本为标准品、人血清或血浆;

所述第一IgG4单克隆抗体指鼠抗人IgG4Fc片段的单克隆抗体,所述第二IgG4单克隆抗体指鼠抗人IgG4Fc片段偶联HRP的单克隆抗体;

所述包被第一IgG4单克隆抗体于固相载体的包被方法为:每100ML包被液由0.05M碳酸盐缓冲液、第一IgG4单克隆抗体和纯化水组成;固相载体容器的每孔加100 μ L包被液,置4 $^{\circ}$ C过夜。

5. 根据权利要求3所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法,其特征在于:所述步骤3) 和步骤5) 使用一种高效清洗液进行清洗。

6. 根据权利要求5所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法,其特征在于:所述高效清洗液的成分和浓度如下:纯化水400mL, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 21.789g, KCl 15.78g, KH_2PO_4 2.916g, NaCl 186.4g, Tween-20 7.2mL, Proclin 132 μ L, 各成分充分溶解后,加纯化水定容至540mL。

7. 根据权利要求3所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法,其特征在于,所述步骤(3) 和步骤(5) 的清洗方法为:洗板机洗板,5次,每次每孔300 μ L清洗液,在吸水纸上拍干。

8. 一种检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的试剂盒,其特征在于,包括以下试剂:

1) 第一IgG4单克隆抗体包被的酶标板:包被酶标板的包被液中第一IgG4单克隆抗体的浓度范围为0.1 μ g/mL-10 μ g/mL;

2) 人IgG4标准品:为6个不同浓度的人IgG4标准品溶液 (Abcam, ab90286), 标准品A为50ng/mL、标准品B为25ng/mL、标准品C为12.5ng/mL、标准品D为6.25ng/mL、标准品E为3.125ng/mL、标准品F为0ng/mL;各标准品均为1mL/瓶,各1瓶;

3) 对照品:人IgG4 (Abcam, ab90286) 阳性对照品1mL/瓶,正常人血清 (Jackson, 货号为009-000-001) 阴性对照品1mL/瓶,1瓶;

4) 辣根过氧化物酶标记的第二IgG4单克隆抗体溶液:150mL/瓶,第二IgG4单克隆抗体浓度0.3 μ g/mL/瓶,1瓶;

5) 样本稀释液:20倍浓缩PBST,15mL/瓶,1瓶;

6) 显色液:显色A液,由无水醋酸钠0.3142g、 β -环状糊精0.2025g、过氧化氢脲0.0697g和纯化水组成,8mL/瓶,1瓶;显色B液,由含柠檬酸0.2355g 10MNaOH 24.3 μ L、丙三醇6.2mL和纯化水组成,8mL/瓶,1瓶;

7) 终止液:浓度为2mol/L的硫酸溶液,10mL/瓶,1瓶;

8) 洗涤液:20倍浓缩PBST,50mL/瓶,1瓶。

9. 根据权利要求8所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还含有锡箔袋、封膜板和说明书。

10. 权利要求1至7所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法和权利要求8、9所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的试剂盒用于IgG4相关性疾病 (IgG4-RD) 的样品的检测和研究的用途。

一种检测人免疫球蛋白G4的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测人免疫球蛋白G4的方法和试剂盒,属于医学检验技术领域。

背景技术

[0002] 人免疫球蛋白G4(简称人IgG4)是人血液中免疫球蛋白G(IgG)四种亚型的第4种,以其在自身免疫性疾病中的独特作用,构成了人类多种自身免疫性疾病的基础,在临床研究自身免疫性疾病中形成了一个新的领域。IgG4相关性自身免疫性疾病是针对体内特异抗原产生了IgG4抗体为特征的一类疾病。IgG4相关性自免疾病的发病机理与其他免疫球蛋白有显著的差异。IgG4与其他免疫球蛋白相比免疫反应迟缓,具有单价功能性结构,在接触抗原后缓慢形成自免抗体,而形成的抗体可以与其他类型IgG竞争,阻断其他类型抗体的致病机制。由于对靶抗原蛋白酶活性的阻断作用也可形成致病性,一部分自身免疫性疾病患者血中的IgG4含量增加,因此将这类疾病命名为IgG4相关性疾病(IgG4-RD)。

[0003] IgG4-RD是一类原因不明的慢性、进行性自身免疫病,患者血清IgG4水平显著增高,受累组织和器官由于大量淋巴细胞和IgG4阳性浆细胞浸润,同时伴有组织纤维化而发生肿大或结节性/增生性病变。IgG4-RD受累器官广泛,可导致多种脏器同时或相继受累,也可只累及一种脏器。最常发病的器官包括胰腺、肝胆系统、唾液腺、泪腺、腹膜后腔和淋巴结。由于IgG4-RD的临床表现多样化,涉及临床多个学科,与消化系统疾病,内分泌系统疾病,特别是与受累器官肿瘤难于区别。因此,在临床上IgG4-RD的漏诊率和误诊率较高。目前对IgG4相关性疾病的诊断主要包括临床表现,影像学 and 受累组织的病理特征。根据IgG4相关性疾病血清中IgG4增高的特点,血清IgG4作为临床诊断IgG4相关性疾病的一项血清学标志物已形成了国际共识。检测血清IgG4浓度已纳入国际IgG4相关性疾病的诊断指南。

[0004] 检测血清IgG4浓度具有一定的临床诊断价值,还可作为判断疾病活动度和预测早期复发,及时评估疗效及监测疾病用药反应的客观指标。2015年版《IgG4相关性疾病管理和治疗的国际共识指南》中明确了血清IgG4的升高是诊断IgG4相关性疾病三个重要指标之一。我国对IgG4相关性疾病的研究起步较晚,对疾病与血清IgG4的研究较少。随着国内医学对该病的重视程度的提升,以及临床诊断方法的完备,对IgG4相关性疾病的诊断和治疗将会有大幅度的发展。

[0005] 目前国内少数三甲医院使用了德国西门子公司生产的免疫球蛋白G4测定试剂盒。该产品作为进口试剂已在国家药监局注册。该产品测定免疫球蛋白G4是根据散射比浊的方法。该方法的检测成本较高,需要特殊仪器设备和专用试剂,因此难于在基层医院普及。同时,该方法使用聚苯乙烯微球颗粒包被抗IgG4抗体作为固相,所包被的抗体属于多克隆抗体。由于人血清免疫球蛋白有四个亚型,亚型分子之间有高度相似性,多克隆抗体难于避免亚型之间的交叉干扰;另外聚苯乙烯微球颗粒包被抗IgG4抗体作为固相测定IgG4的灵敏度较低,表现为散射比浊法IgG4定值显著高于ELISA方法使用高特异性IgG4双单克隆抗体的检测。人血清IgG4基础值高的一个可能性是检测的特异性不足,可能包括了其他免疫球蛋白。因此对特异性识别人血清中IgG4的变化有潜在的风险。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是：首先，提供一种简便、快速的人免疫球蛋白G4高特异性，高稳定性和高灵敏度的定量检测方法；第二，提供一种简便、快速、临床实用的高特异性，高稳定性及高灵敏度的定量检测试剂盒。为实现上述目的，本发明采用以下技术方案。

[0007] 一种检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法，使用两个高特异性抗IgG4 Fc片段的单克隆抗体，第一个对IgG4特异的单克隆抗体与固相载体结合，该抗体为第一IgG4 单克隆抗体，第二个对IgG4特异的单克隆抗体被一种过氧化物酶标记，该抗体为第二IgG4 单克隆抗体；第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体均与检测样本中存在的IgG4 结合，形成第一IgG4单克隆抗体-IgG4-酶标第二IgG4单克隆抗体的复合物并固定于固相载体上；第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体对IgG4的结合不构成竞争，且由于两个对IgG4特异结合的单克隆抗体均结合于IgG4分子的Fc段而具有高稳定性；固相载体上的第一IgG4单克隆抗体与被检测样本中的IgG4结合呈现剂量相关性，被结合的IgG4依然保持与氧化酶标记的第二IgG4单克隆抗体的结合，并根据被结合的IgG4 的量决定氧化酶标记的第二IgG4单克隆抗体的量，由第二IgG4单克隆抗体标记的氧化酶与酶底物的生色反应定量被测样本中存在的IgG4。本项对生物样本IgG4含量的检测方法实现了对生物样本中IgG4定量检测的高稳定性和高特异性。

[0008] 所述第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体针对IgG4分子中Fc片段。基于高稳定融合蛋白以提高药物在体内的稳定性，以及根据成功案例中蛋白药物与IgG4 Fc段融合提高蛋白质稳定性。通过检测IgG4Fc段来优化监测人血中IgG4在临床IgG4 相关性疾病的浓度和变化，提高检测病人血中IgG4的稳定性。采用的固相抗体第一IgG4 单克隆抗体是英国抗体试剂公司生产的抗人IgG4重链单克隆抗体 (Abcam, ab1930)；第二IgG4单克隆抗体为Abcam公司生产的IgG4Fc段酶标记单克隆抗体 (Abcam, ab99817)。以双抗体组合对IgG4的检测，规避由于生物样本中IgG4分子Fab段被代谢所造成的测定不稳定性。

[0009] 所述第一和第二Fc段单克隆抗体具有对IgG4蛋白分子的高选择性。本设计是基于生物样本中存在的IgG包含有四种亚型 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)，其四种亚型的结构差异由IgG铰链区长度和二硫键的位置构成，而IgG铰链区和二硫键的位置均位于Fc段。

[0010] 遗传工程技术的进步促进了蛋白质药物的迅速发展。但是体内蛋白酶变性或分解蛋白质构成蛋白在体内浓度的不稳定性。为提高蛋白质药物的体内稳定性所建立的蛋白质融合技术通过蛋白质药物与其它高稳定蛋白分子的融合可以提高蛋白质的稳定性。目前成功的案例主要是蛋白药物与免疫球蛋白Fc段之间的融合。

[0011] 免疫球蛋白Fc区，除抗原结合能力(免疫球蛋白的主要功能)之外，还负责效应子功能，如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)；此外，存在于Fc区的FcRn序列具有通过缀合至体内FcRn受体来增加体内半衰期而稳定血清中的IgG水平的作用。在利用免疫球蛋白Fc的序列制备融合蛋白质的案例中，IgG4 Fc得到广泛应用。据此，本发明设计了通过检测IgG4Fc段来优化监测人血中IgG4在临床IgG4相关性疾病的浓度和变化，使检测病人血中IgG4的稳定性更好。采用的固相抗体是英国抗体试剂公司生产的抗人IgG4重链单克隆抗体 (Abcam, ab1930)。由于免疫球蛋白重链包括了Fab和Fc段，发明人对ab1930做了筛选。使用Fc段抗原确定了 ab1930单克隆抗体的抗原决定簇位于Fc段。为了保证最大化排除与IgG4具有结构相似性的IgG1, IgG2, IgG3的非特异性结合，选用了Abcam公

司生产的IgG4Fc段酶标记单克隆抗体(Abcam,ab99817)作为反应体系中的第二抗体。这样的组合对IgG4的检测构成了目前生物技术领域中最高的特异性和稳定性。

[0012] 本项发明所述的第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体均针对IgG4分子的Fc段。对于抗体而言,Fc片段具有高稳定性,市场上多种生物蛋白药物例如美国里来制药公司(Eli Lilly)生产的长效降血糖药物杜拉鲁肽(Trulicity®),是在高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)类似物上融合了一个IgG4的Fc片段以使高血糖素样肽-1生物半衰期从数分钟到数天。免疫球蛋白G主要由Fab和Fc段组成。Fc段可以结合多种细胞的Fc受体而更为稳定。使用针对IgG4 Fc特异性单克隆抗体,一是可以增加检测的稳定性,即使血样本中的IgG4发生代谢,Fc段在血中保持时间长,有利于追踪IgG4在疾病中已出现的变化;二是提高了本发明的高特异性,虽然IgG四种亚型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)均有两条相同的轻链和重链组成,氨基酸序列之间具有95%的相似性,但各亚型结构主要的不同之处为铰链区的长度和二硫键的位置,而这些差异正好位于Fc片段,因此Fc片段特异性抗体对IgG4 Fc段的结合更有效避免与其他亚型的交叉反应,保证了对IgG4的高特异性。

[0013] 所述第一IgG4单克隆抗体和第二IgG4单克隆抗体之间不形成相互竞争。

[0014] 所述的两个对IgG4特异结合的单克隆抗体由英国Abcam公司生产,具有权利要求1中所描述的性质。两个抗体的货号分别为ab1930和ab99817。

[0015] 两个IgG4单克隆抗体由Abcam公司生产。为确定两个单克隆抗体不构成竞争作用,对两个单克隆抗体组合进行了筛选试验,虽然两个特异性抗体都是针对Fc片段的,实验结果证实两个抗体与IgG4的Fc片段的结合位点不同,第一个抗体在与IgG4结合后不影响第二个抗体与第一抗体和IgG4的复合物的结合。

[0016] 检测样本中人免疫球蛋白G4(IgG4)的方法,包括如下步骤:

[0017] 1) 处理待测样本:以体积比1:10000稀释待检测样品,取10 μ L样品加入到1mL 样品稀释液中,震荡混匀,从其中取10 μ L加入到1mL样品稀释液中,震荡混匀;

[0018] 2) 加样:向包被有第一IgG4单克隆抗体的固相载体容器中加入不同浓度的IgG4标准品溶液和稀释的待测样本,100 μ L/孔,用封板膜封板后置20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C室温静置30分钟,使其与固定在固相载体容器上的第一IgG4单克隆抗体Fc片段结合;

[0019] 3) 洗涤:清洗去除固相载体容器中未结合的样本成分,每次每孔加入300 μ L高效清洗液,清洗4-6次,在吸水纸上拍干;

[0020] 4) 加酶标二抗:向固相载体容器中加入高特异性的辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二IgG4单克隆抗体溶液,每孔加入100 μ L,用封板膜封板后置20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C室温静置30分钟,使酶标记的第二IgG4单克隆抗体与待测样本中的IgG4结合,从而使酶标第二 IgG4单克隆抗体固定在微孔板上;

[0021] 5) 洗涤:清除固相载体中未结合的酶标第二IgG4单克隆抗体,每次每孔加入300 μ L高效清洗液,清洗4-6次,在吸水纸上拍干;

[0022] 6) 显色:向固相载体容器中加入TMB(四甲基联苯胺)显色,将显色A液和B液按 1:1比例混匀,每孔加入100 μ L,室温避光轻震15分钟;TMB在HRP酶的催化下形成蓝色的阳离子产物;

[0023] 7) 终止:向固相载体容器中每孔加入终止液50 μ L,轻震混匀以终止反应,蓝色溶液转变为黄色;在单波长450nm或双波长450/630nm下依序测量各孔的OD值用分光光度计测定

有色溶液的OD值；

[0024] 8) 通过标准曲线法测定待测样本中IgG4的值：

[0025] A. 绘制标准曲线：计算每个浓度标准品双复孔OD值的平均值，以标准品的浓度 (ng/mL) 为横坐标，对应的OD值为纵坐标，使用数据分析软件 (Origin8) 绘制标准曲线；

[0026] B. 结果判断：根据正常人群IgG4样本浓度均值+3SD为阳性判断值 (cut-off 值，0.212g/L)，对 $\geq 0.212\text{g/L}$ 的样本判定为阳性样本； $< 0.212\text{g/L}$ 判定为阴性样本。检测值在0.173g/L-0.212g/L范围内提示接近阳性判定值，建议复测。

[0027] 所述的检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的方法：

[0028] 所述固相载体容器为96孔或48孔聚苯乙烯酶标板；所述待测样本为标准品、人血清或血浆；

[0029] 所述第一IgG4单克隆抗体指鼠抗人IgG4 Fc片段的单克隆抗体，所述第二IgG4单克隆抗体指鼠抗人IgG4 Fc片段偶联HRP的单克隆抗体。

[0030] 所述包被第一IgG4单克隆抗体于固相载体的包被方法为：每100ML包被液由0.05M碳酸盐缓冲液、第一IgG4单克隆抗体和纯化水组成；固相载体容器的每孔加100 μL 包被液，置4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

[0031] 本发明所述洗涤步骤使用的清洗试剂为高效清洗液并应用于方法中的所述步骤3) 和步骤5) 使用一种高效清洗试液进行清洗。

[0032] 所述高效清洗液的成分和浓度如下：纯化水400mL, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 21.789g, KCl 15.78g, KH_2PO_4 2.916g, NaCl 186.4g, Tween-20 7.2mL, Proclin132 μL ，各成分充分溶解后，加纯化水定容至540mL。

[0033] 本发明方法所述步骤3) 和步骤5) 的清洗过程中使用了新清洗液配方，包括了特定比例的Tween-20和Proclin132。该配方适用于本方法抗人IgG4 Fc段单克隆抗体作为固相与人IgG4标准品或人血清样本中IgG4结合后高效清除血清中非IgG4的成分 (方法步骤(3))；并适用于固相载体上第一抗体与样本中IgG4结合物再与第二标记过氧化酶的IgG4单克隆抗体结合后清除酶标第二抗体的非特异性结合 (方法步骤(5))。

[0034] 所述步骤3) 和步骤5) 的清洗方法为：洗板机洗板，5次，每次每孔300 μL 高效清洗液，在吸水纸上拍干。清洗方法可快速高效的洗去未结合的成分，有效降低背景干扰，提高灵敏度，避免假阳性。

[0035] 本发明涉及的方法是依据免疫学原理和实验过程获得的一种高特异性和高灵敏度的人血清IgG4检测方法。所涉及的技术发明特征包括，(1) 选择了具有高稳定性特征的人免疫球蛋白Fc段作为检测IgG4的技术指标，验证选择了两个对人IgG4分子具有高特异性，但不形成相互竞争的IgG4 Fc段单克隆抗体；(2) 建立了包括使用一种减少非特异性结合的高效清洗液及清洗技术在内的检测方法。(3) 经试验验证，本发明方法可特异性识别人血清中IgG4，对样本中其他免疫球蛋白亚型 (IgG1、IgG2、IgG3) 无识别，呈现检测IgG4的高度特异性。在反应体系中外加定量人IgG4后，与其他市场上 IgG4检测方法 (德国西门子公司生产的IgG4免疫散射比浊检测方法) 进行的平行对比回收实验发现，本方法可以准确检测出反应体系中外加的10微克IgG4 (反应溶液终浓度为0.1g/L)，而同类产品 (免疫散射比浊方法) 没有检测出该浓度的IgG4，表明本方法对IgG4的检测灵敏度优于德国西门子公司生产的IgG4免疫散射比浊检测方法。本方法与已在国内外临床使用的IgG4测定试剂盒 (德国西

门子公司,散射比浊法)作了同批临床血清样本的平行比对。两个方法的临床阳性样本检测符合率超过90%,提示本方法与中国药监局验证批准的同类进口试剂对人血清IgG4的检测具有等效性。

[0036] 本发明提供了一种检测样本中人免疫球蛋白G4 (IgG4) 的试剂盒,包括以下试剂:

[0037] 1) 第一IgG4单克隆抗体包被的酶标板:包被酶标板的包被液中第一IgG4单克隆抗体的浓度范围为0.1 μ g/mL-10 μ g/mL;

[0038] 2) 人IgG4标准品:为6个不同浓度的人IgG4标准品溶液 (Abcam, ab90286), 标准品A为50ng/mL、标准品B为25ng/mL、标准品C为12.5ng/mL、标准品D为6.25ng/mL、标准品E为3.125ng/mL、标准品F为0ng/mL;各标准品均为1mL/瓶,各1瓶;

[0039] 3) 对照品:人IgG4 (Abcam, ab90286) 阳性对照品1mL/瓶,正常人血清 (Jackson, 货号为009-000-001) 阴性对照品1mL/瓶,1瓶;

[0040] 4) 辣根过氧化物酶标记的第二IgG4单克隆抗体溶液:150mL/瓶,第二IgG4单克隆抗体浓度0.3 μ g/mL/瓶,1瓶;Abcam, 货号ab99817;

[0041] 5) 样本稀释液:20倍浓缩PBST,15mL/瓶,1瓶;

[0042] 6) 显色液:显色A液,由无水醋酸钠0.3142g、 β -环状糊精0.2025g、过氧化氢脲0.0697g和纯化水组成,8mL/瓶,1瓶;显色B液,由含柠檬酸0.2355g 10MNaOH 24.3 μ L、丙三醇6.2mL和纯化水组成,8mL/瓶,1瓶;

[0043] 7) 终止液:浓度为2mol/L的硫酸溶液,10mL/瓶,1瓶;

[0044] 8) 洗涤液:20倍浓缩PBST,50mL/瓶,1瓶。

[0045] 所述试剂盒还含有锡箔袋、封膜板和说明书。

[0046] 本发明的技术原理是采用双单克隆抗体与待测物质IgG4形成三联复合物,选择抗IgG4抗体Fc段为固相载体,通过对待测物质IgG4的高度特异性和稳定性,有效避免了与IgG4结构类似的IgG1、IgG2、IgG3的非特异结合。通过第二个高特异性IgG4 Fc 段酶标记单克隆抗体加强了针对IgG4的识别和检测的特异性。用高效清洗液去除样本中非特异性干扰物质成分,经过反应液中加入HRP酶底物TMB显色,通过系列已知浓度 IgG4标准品在反应体系中呈现IgG4浓度相关的OD值。在3ng/mL-50ng/mL标准品范围内获得线性回归系数R²值大于0.99的剂量反应关系(图1),准确定量待测物IgG4 在人生物样本中的浓度。本发明方法和试剂盒适用于临床上对“IgG4相关性疾病 (IgG4- RD)”的样品的检测。本发明方法和试剂盒还适用于临床上对其他多种与IgG4有关的疾病的研究和样本检测。

[0047] 本发明提供了一种具有高特异性,简便、快速、准确检测人血清样本中人免疫球蛋白G4含量的实用方法,以及适用于基础科研和临床检验的试剂盒。试剂盒具有成本低,耗时短,准确,操作简便,不需要特殊仪器和试剂,在一般临床检验实验室条件下即可完成等特点。

[0048] 应用本发明方法验证IgG4浓度与光信号之间具有优良的对应关系。验证方法具体描述为选用接近标准曲线最高值的一个已知IgG4浓度做对半稀释成5个浓度进行检测,用标准曲线确定每个稀释样本的IgG4浓度然后做线性回归分析。线性回归系数大于0.99(图2)。

[0049] 所选择的两个IgG4单克隆抗体对人IgG4的结合无竞争性抑制作用;与其他三种人免疫球蛋白亚型1、2、3无交叉反应(表1),呈现了对IgG4高特异性。在反应体系里外加10微

克IgG4 (浓度为0.1mg/mL),本方法可准确检测出所加的IgG4的量。与国内已注册进口IgG4测定试剂盒(德国西门子公司,散射比浊法)对比实验发现,进口 IgG4测定试剂盒未检测到在反应体系里外加10微克IgG4 (浓度为0.1mg/mL) (表2),表明本发明方法具有较高的灵敏度。本方法与中国已注册IgG4测定试剂盒(德国西门子公司,散射比浊法)的同批临床血清样本平行IgG4检测对比中临床阳性样本检测符合率超过90% (表3),说明本方法与已在中国国家药监局验证注册的进口产品《免疫球蛋白G4测定试剂盒(散射比浊法)》具有对临床血清样本IgG4检测的等效性。

[0050] 实验数据表明,本方法的批内差小于10%,批间差小于15% (表3)。对人血清IgG4的检测无需特殊实验设备,操作流程简便快捷。全部操作可在2小时内完成。

[0051] 本发明的优点如下:提供了一种具有高特异性,可简便、快速、准确检测人血清样本中人免疫球蛋白G4含量的实用方法和适用于基础科研和临床检验的试剂盒。成本低,耗时短,准确,操作简便,不需要特殊仪器和试剂,在一般临床检验实验室条件下即可完成,与临床使用的市售试剂盒相比较具有显著的优势。适用于临床普及使用可以在临床诊断中广泛普及。

[0052] 下面结合具体实施例和附图对本发明做进一步说明,并不以任何方式限制本发明的保护范围,凡是依照本发明公开内容进行的本领域等同替换,均属于本发明的保护范围。

附图说明

[0053] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明。

[0054] 图1示出采用本发明的试剂盒检测人免疫球蛋白G4的标准曲线图

[0055] 图2示出稀释样本的IgG4浓度线性回归分析

具体实施方式

[0056] 实施例1:一种检测IgG4抗体浓度的试剂盒

[0057] 一.试剂盒组成:

[0058] 表1:试剂盒组成

	成分	规格	数量
[0059]	说明书	A4	1 份
	封板膜	/	3 张

	锡箔袋	140×190 mm	1 个
酶标板	可拆卸 96 孔酶标板	96 人份	1 块
标准品	标准品 A (50 ng/mL)	1 mL/瓶	1 瓶
	标准品 B (25 ng/mL)	1 mL/瓶	1 瓶
	标准品 C (12.5 ng/mL)	1 mL/瓶	1 瓶
	标准品 D (6.25 ng/mL)	1 mL/瓶	1 瓶
	标准品 E (3.125 ng/mL)	1 mL/瓶	1 瓶
	标准品 F (0 ng/mL)	1 mL/瓶	1 瓶
对照品	阳性对照品	1 mL/瓶	1 瓶
	阴性对照品	1 mL/瓶	1 瓶
酶标二抗液	HRP 标记的鼠抗人 IgG4	15 mL/瓶	1 瓶
样品稀释液	20 倍浓缩 PBST	15mL/瓶	1 瓶
显色液	显色 A 液	8 mL/瓶	1 瓶
	显色 B 液	8 mL/瓶	1 瓶
终止液	终止液	10 mL/瓶	1 瓶
高效清洗液	20 倍浓缩 PBST	50 mL/瓶	1 瓶

[0061] 二. 制备方法

[0062] 1. 酶标板的制备

[0063] 1.1 包被液的配制

[0064] 表2

名称	数量	设备/仪器	工作场所	备注
0.05M 碳酸盐 包被缓冲液	80mL	量筒	十万级区配 液室	将 IgG4 单克隆抗体用涡旋混合器混匀后倒入烧杯中, 按照磁力搅拌器使用规程, 将设备设定为规定使用范围, 使各成分充分溶解, 混匀。
IgG4Fc 抗体*	33.3μL	移液枪		
纯化水定容至 100mL 转移至包被液专用试剂瓶				

[0066] *表2中 IgG4Fc 抗体为第一 IgG4 单克隆抗体, 由 Abcam 公司生产, 货号分别为 ab1930。

[0067] 1.2 酶标板的包被

[0068] 在十万级区的包被室用包被机给 96 孔酶标板的每孔加 100μL 包被液, 置 4℃ 过夜。

[0069] 1.3 封闭液的配制

[0070] 表3

名称	数量	仪器/设备	工作场所	备注
[0071] 1×PBST	160mL	量筒	十万级区配液室	倒入烧杯中，按照磁力搅拌器使用规程，将设备设定为规定使用范围，使各成分充分溶解，混匀。
BSA	1g	分析天平	十万级区称量室	
纯化水定容至 200mL 转移至封闭液专用试剂瓶				

[0072] 1.4酶标板的封闭

[0073] 弃去包被液，洗涤1次（每孔加入300uL1×PBST，静置2min，甩掉孔内溶液，拍干）。用移液枪给96孔酶标板的每孔中加入200μL封闭液，25℃培养箱静置封 1.5h。

[0074] 1.5酶标板的干燥

[0075] 弃去封闭液，洗涤1次（每孔加入300uL 1×PBST，静置2min，甩掉孔内溶液，拍干）。置于25℃烘箱干燥5h。

[0076] 1.6酶标板的保存

[0077] 待包被板干燥后，将酶标板放入铝箔袋中，再向其中放入一枚干燥剂，抽真空塑封。

[0078] 4℃保存。

[0079] 2.标准品和阴阳性对照品的制备

[0080] 2.1标准品的配制：

[0081] 从-80℃超低温冰箱中取出人IgG4蛋白 (Abcam, 货号为ab90286), 浓度为 1.04mg/mL, 在万级负压阳性室的生物安全柜中取45μL样品稀释液至200μL的离心管中, 再向离心管中加入5μL浓度为1.04mg/mL的人IgG4蛋白, 用涡旋混合器7 档混匀30s, 终浓度为104μg/mL。取20mL稀释好的样品稀释液至50mL的离心管中, 再向离心管中加入终浓度为104μg/mL人IgG4蛋白9.6μL, 用涡旋混合器7档混匀 30s, 此时该溶液中人IgG4蛋白的浓度为50ng/mL, 然后2倍梯度依次稀释, 标准曲线从50ng/mL开始两倍梯度稀释到3.125ng/mL。

[0082] 2.2阴阳性对照品的配制

[0083] 2.2.1阳性对照品的配制

[0084] 从-80℃超低温冰箱中取出阳性对照品人IgG4蛋白 (Abcam, ab90286), 浓度为 1.04mg/mL, 在万级负压阳性室的生物安全柜中取35μL稀释好的样品稀释液至200μL 的离心管中, 再向离心管中加入0.35μL浓度为1.04mg/mL的阳性对照品人IgG4, 用涡旋混合器7 档混匀30s, 终浓度为10.4μg/mL。取10mL稀释好的样品稀释液至15mL的离心管中, 再向离心管中加入终浓度为10.4μg/mL阳性对照品人IgG4溶液34.6μL, 用涡旋混合器7档混匀30s, 即为阳性对照品。

[0085] 2.2.2阴性对照品的配制

[0086] 从-80℃超低温冰箱中取出正常人血清 (Jackson, 货号为009-000-001), 在万级负压阳性室的生物安全柜中取10mL稀释好的样品稀释液至15mL的离心管中, 再向离心管中加入1μL正常人血清, 用涡旋混合器7档混匀30s, 即为阴性对照品。

[0087] 2.3分装

[0088] 质检合格后, 在万级区的生物安全柜中按1mL/瓶的装量要求分别将其分装至白色

小试剂瓶中,标准品加盖白色小瓶盖,阳性对照品加盖红色小瓶盖,阴性对照品加盖蓝色小瓶盖。

[0089] 3. 酶标二抗液的制备

[0090] 3.1 酶标二抗液的配制

[0091] 表4

名称	数量	设备/仪器	工作场所	备注
HRP 偶联物稀释剂 II	150mL	量筒	十万级区 配液室	倒入烧杯中,按照磁力搅拌器使用规程,将设备设定为规定使用范围,使各成分充分溶解,混匀。
鼠抗人 IgG4 Fc(HRP)*	75 μ L	移液枪		
混匀后转移至酶标二抗液 IgG4 专用试剂瓶				

[0093] *表4中鼠抗人IgG4Fc (HRP) 为第二IgG4单克隆抗体,由Abcam公司生产,货号分别为ab99817。

[0094] 3.2 分装

[0095] 质检合格后,在十万级区分装室按15mL/瓶的装量要求将其分装至白色试剂瓶,加盖蓝色瓶盖。

[0096] 4. 样品稀释液的制备

[0097] 4.1 样品稀释液的配制

[0098] 表5

名称	数量	设备/仪器	工作场所	备注
纯化水	128mL	量筒	十万级区配液室	倒入烧杯中,按照磁力搅拌器使用规程,将设备设定为规定使用范围,使各
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	14.651g	分析天平	十万级区称量	
KCl	0.785g	移液枪	室	成分充分溶解,混匀。
NaCl	5.98g			
Tween-20	1.6mL		十万级区配液室	
Proclin	40 μ L			
纯化水定容至 160mL 转移至样品稀释液专用试剂瓶				

[0101] 4.2 分装

[0102] 质检合格后,在十万级区的液体分装室按15mL/瓶的装量要求将其分装至白色试剂瓶,加盖黄色瓶盖。

[0103] 5. 显色液的制备

[0104] 5.1显色液A的配制

[0105] 表6

名称	数量	仪器/设备	工作场所	备注
纯化水	54mL	量筒	十万级区配液室	倒入烧杯中，按照磁力搅拌器使用规程，将设备设定为规定使用范围，使各成分充分溶解，混匀。
无水醋酸钠	0.3142g	分析天平	十万级区称量室	
β -环状糊精	0.2025g			
过氧化氢脲	0.0697g			
纯化水定容至 81mL 转移至显色 A 液专用棕色试剂瓶				

[0107] 5.2显色液B的配制

[0108] 表7

名称	数量	仪器/设备	工作场所	备注
纯化水	47mL	量筒	十万级区配液室	倒入烧杯中，按照磁力搅拌器使用规程，将设备设定为规定使用范围，使各成分充分溶解，混匀。
柠檬酸	0.2355g	分析天平	十万级区称量室	
10M NaOH	24.3 μ L	移液枪	十万级区配液室	
丙三醇	6.2mL	移液枪		
纯化水定容至 81mL 转移至显色 A 液专用棕色试剂瓶				

[0110] 5.3分装

[0111] 质检合格后，在十万级区的分装室按8mL/瓶的装量要求将其分装至棕色试剂瓶中，加盖棕色瓶盖。

[0112] 6. 终止液的制备

[0113] 6.1终止液的配制

[0114] 在十万级区配液室用量筒准确量取10.87mL的浓硫酸，将其缓慢加入含有50mL纯化水的烧杯中稀释，用磁力搅拌器缓慢搅拌混匀，再量取20mL纯化水冲洗量取浓硫酸的量筒，将其倒入100mL量具中再加入一定量的纯化水定容至100mL，使其终浓度为2mol/L。定容后，将溶液转移至终止液专用试剂瓶。

[0115] 6.2分装

[0116] 质检合格后，在十万级区的分装室按10mL/瓶的装量要求将其分装至白色试剂瓶，加盖红色瓶盖。

[0117] 7. 浓缩洗涤液的制备

[0118] 7.1浓缩洗涤液的配制

[0119] 表8

名称	数量	设备/仪器	工作场所	备注
纯化水	400mL	量筒	十万级区配液室	倒入烧杯中，按照磁力搅拌器使用规程，将设备设定为规定使用范围，使各成分充分溶解，混匀。
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	21.789g	分析天平	十万级区称量室	
KCl	5.78g			
KH ₂ PO ₄	2.916g			
NaCl	86.4g			
Tween-20	7.2mL	移液枪	十万级区配液室	
Proclin	132μL			
纯化水定容至 540mL 转移至缩洗涤液专用试剂瓶				

[0121] 7.2分装

[0122] 质检合格后，在十万级区的分装室按50mL/瓶的装量要求将其分装至白色大试剂瓶，加盖白色大瓶盖。

[0123] 8. 试剂盒的组装

[0124] 本发明试剂盒包装时按照以下要求执行：

[0125] 8.1将试剂盒的盒子与内衬组装。

[0126] 8.2依次将分装好的标准品A、B、C、D、E、F、阳性对照品、阴性对照品顺序放入试剂盒内衬的8个小孔内。

[0127] 8.3将酶标二抗液、样品稀释液、显色A液、显色B液、终止液顺序放入试剂盒内衬的5个中孔内。

[0128] 8.4将洗涤液放入试剂盒内衬的大孔内。

[0129] 8.5将塑封好的酶标板直接平放于试剂盒内。

[0130] 8.6将3张封板膜平放于试剂盒内。

[0131] 8.7将说明书折好平放于试剂盒内。

[0132] 8.8将试剂盒盖好并放入4℃冰柜中保存。

[0133] 三、试剂盒的使用方法

[0134] 1.准备工作

[0135] 1.1所有试剂和样品使用前恢复至室温并混匀。

[0136] 1.2样品稀释液和浓缩洗涤液均为20X，使用前需稀释到1X，根据实验需用量，将浓缩洗涤液或样品稀释液用双蒸水按1:19 (v:v) 稀释。

[0137] 1.3以1:10000 (v:v) 稀释待检测样品。建议取10μL样品加入到1mL样品稀释液中，震荡混匀，从其中取10μL加入到1mL样品稀释液中，震荡混匀。稀释的样品室温下需在8h内使用。

[0138] 1.4每次测定血清时应同时做标准曲线，最好做复孔。若样品中待测物质含量过高(样品OD值大于标准品A的OD值)，请先用样品稀释液稀释一定倍数(n倍)后再测定，使其检测值在标准曲线线性范围内，计算时再乘以相应的稀释倍数。

- [0139] 2.具体操作步骤
- [0140] 2.1准备足够的微孔板条,并提前稀释好待测的病人血清。
- [0141] 2.2加样
- [0142] 于微孔板中加入100 μ L不同浓度IgG4标准品和血清样品。标准品的浓度分别为50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、0ng/mL。
- [0143] 2.3孵育
- [0144] 用封板膜封板后置室温(20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C)静置30分钟。
- [0145] 2.4洗涤
- [0146] 洗板机洗板:5次,每次每孔300 μ L高效清洗液,最后在吸水纸上拍干。
- [0147] 2.5加酶标二抗
- [0148] 每孔加入稀释好的酶标二抗液100 μ L。
- [0149] 2.6孵育
- [0150] 操作同2.3。
- [0151] 2.7洗涤
- [0152] 操作同2.4。
- [0153] 2.8显色
- [0154] 将显色A液和B液按1:1比例混匀,每孔加入100 μ L,室温避光轻震15分钟。
- [0155] 2.9终止
- [0156] 每孔加入终止液50 μ L,轻震混匀以终止反应(孔中颜色由蓝色变为黄色)。
- [0157] 2.10测定
- [0158] 在单波长450nm(或双波长450/630nm)下依序测量各孔的OD值。
- [0159] 3.绘制标准曲线
- [0160] 计算每个浓度标准品双复孔OD值的平均值,以标准品的浓度(ng/mL)为横坐标,对应的OD值为纵坐标,使用数据分析软件(Origin8)绘制标准曲线。
- [0161] 4.阳性判断值或者参考区间
- [0162] 使用本发明方法和产品完成对大量的无相关疾病的健康人群的血清进行检测。所得到的样品浓度均值+3SD为阳性判断值(cut-off值)为0.212g/L, \geq 0.212g/L可判定为阳性; $<$ 0.212g/L判定为阴性。当检测值在0.173g/L-0.212g/L范围提示接近阳性判定值,建议复测。
- [0163] 实施例2.检测样本中人免疫球蛋白G4的方法
- [0164] 一、材料和方法
- [0165] 1.材料:
- [0166] (1)实施例1的试剂盒
- [0167] (2)已知稀释IgG4浓度样本为患者样本,该样本来自山西医科大学第一医院消化内科住院部的一名男性患者,其IgG4的浓度通过本试剂盒测得为0.401g/L。
- [0168] (3)待测患者样本:血清样本由山西医科大学第一医院消化内科提供,样本例数为49例,采集人为许翠萍,采集日期为2017年3月到7月,采集地址为山西医科大学第一医院消化内科住院部,电话为0351-4639020。
- [0169] 2.方法:

[0170] (1) 处理待测样本:以体积比1:10000稀释待检测样品,取10 μ L样品加入到1 mL样品稀释液中,震荡混匀,从其中取10 μ L加入到1mL样品稀释液中,震荡混匀;

[0171] (2) 加样:向包被有第一IgG4单克隆抗体的固相载体容器(96孔板)中加入不同浓度的IgG4标准品溶液和稀释好的待检测样本,100 μ L/孔,用封板膜封板后置20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C室温静置30分钟,使其与固定在固相载体容器上的第一IgG4抗体Fc片段结合;

[0172] (3) 洗涤:清洗去除固相载体容器中未结合的样本成分,每次每孔加入300 μ L高效清洗液,清洗5次,在吸水纸上拍干;

[0173] (4) 加酶标二抗:向固相载体容器中加入高特异性的辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二IgG4单克隆抗体溶液,每孔加入100 μ L,用封板膜封板后置20 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C室温静置30分钟,使酶标记的第二IgG4单克隆抗体与待测样本中的IgG4结合,从而使酶标第二IgG4单克隆抗体固定在微孔板上;

[0174] (5) 洗涤:清洗去除固相载体容器中未结合的酶标第二IgG4单克隆抗体,每次每孔加入300 μ L高效清洗液,清洗5次,在吸水纸上拍干;

[0175] (6) 显色:向固相载体容器中加入四甲基联苯胺(TMB)显色,将显色A液和B液按1:1比例混匀,每孔加入100 μ L,室温避光轻震15分钟;TMB在HRP酶的催化下形成蓝色的阳离子产物;

[0176] (7) 终止:向固相载体容器中每孔加入终止液50 μ L,轻震混匀以终止反应,蓝色溶液转变为黄色;在单波长450nm或双波长450/630nm下依序测量各孔的OD值用分光光度计测定有色溶液的OD值;

[0177] (8) 通过标准曲线法测定待测样本中IgG4的值:

[0178] A. 绘制标准曲线:计算每个浓度标准品双复孔OD值的平均值,以标准品的浓度(ng/mL)为横坐标,对应的OD值为纵坐标,使用数据分析软件(Origin8)绘制标准曲线;

[0179] B. 结果判断:所得到的样本浓度均值+3SD为阳性判断值(cut-off值)为0.212g/L, \geq 0.212g/L可判定为阳性; $<$ 0.212g/L判定为阴性;当检测值在0.173g/L-0.212 g/L范围提示接近阳性判定值,建议复测。

[0180] 二. 结果

[0181] 1. 建立的标准曲线

[0182] 图1显示采用本发明的试剂盒检测人免疫球蛋白G4的标准曲线图。标准品的浓度分别为50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、0ng/mL。计算每个浓度标准品双复孔OD值的平均值,以标准品的浓度(ng/mL)为横坐标,对应的OD值为纵坐标,使用数据分析软件(Origin8)绘制标准曲线。

[0183] 2. 稀释样本的IgG4浓度线性回归分析

[0184] 用已知IgG4浓度做对半稀释(该样本来自山西医科大学第一医院消化内科住院部的一名男性患者,其IgG4的浓度通过本试剂盒测得为0.401g/L)5个浓度(40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL和3ng/mL)进行检测,用标准曲线确定每个稀释样本的IgG4浓度,然后做线性回归分析。线性回归系数也大于0.99。

[0185] 图2为稀释样本的IgG4浓度线性回归分析结果。

[0186] 实施例3. 试剂盒及方法特异性实验

[0187] 一. 材料和方法

[0188] 1.材料

[0189] (1) 实施例1试剂盒

[0190] (2) IgG1, IgG2, IgG3样品, IgG1购自Abcam, 货号为ab90283; IgG2购自Abcam, 货号为ab90284; IgG3购自Sino.Biological Inc, 货号为13906-HNAH.

[0191] 2.方法

[0192] 将IgG1, IgG2, IgG3各分别稀释为以下几个浓度的待测样本: 1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、100ng/mL和50ng/mL;

[0193] 使用本发明试剂盒对不同浓度的IgG1, IgG2, IgG3 (1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、100ng/mL和50ng/mL) 分别进行测值, 方法同实施例2的检测方法。

[0194] 二.结果

[0195] 测定结果见表9所示, 发现OD值均接近空白孔。根据结果, 可以确认本发明建立的方法不会与IgG亚型1、2、3结合, 因此, 认为本发明具有高特异性。

[0196] 表9. 不同浓度IgG1, IgG2, IgG3在本发明试剂盒上的测值结果

IgG4 标准曲线 OD 值依次为: 2.02; 1.60; 0.87; 0.47; 0.19; 0.03		
样本	OD 值	IgG4 含量
IgG1 1000ng/ml	0.0324	--
IgG1 500ng/ml	0.0375	--
IgG1 250ng/ml	0.0323	--
IgG1 100ng/ml	0.0379	--
IgG1 50ng/ml	0.0340	--
IgG2 1000ng/ml	0.0364	--
IgG2 500ng/ml	0.0319	--
IgG2 250ng/ml	0.0323	--
IgG2 100ng/ml	0.0380	--
IgG2 50ng/ml	0.0351	--
IgG3 1000ng/ml	0.0345	--
IgG3 500ng/ml	0.0311	--
IgG3 250ng/ml	0.0329	--
IgG3 100ng/ml	0.0302	--
IgG3 50ng/ml	0.0325	--

[0198] 实施例4. 试剂盒及方法灵敏度实验

[0199] 一.材料和方法

[0200] 1.材料

[0201] (1) 实施例1试剂盒

[0202] (2) 待测样本寄送到山西迪安医学检验中心(第三方医学诊断机构), 测定人IgG4的含量并出具检测报告单。样本测值由第三方医学诊断机构完成, 准确可靠。迪安使用的是

德国西门子的免疫球蛋白G4测定试剂盒(散射比浊法)。

[0203] (3)待测样本如下:

[0204] A. 阴性血清;

[0205] B. 阴性血清外加10 μ g IgG4;

[0206] C. 阴性血清外加10 μ g IgG4,并加入IgG1,IgG2各10 μ g;

[0207] D. 阴性血清外加10 μ g IgG4,并加入IgG1,IgG2,IgG3各10 μ g。

[0208] 2. 方法

[0209] (1) 本发明检测方法同实施例3。

[0210] (2) 西门子试剂盒检测方法参照该试剂盒说明书。

[0211] 二. 结果

[0212] 使用本发明试剂盒与德国西门子IgG4试剂盒对以下样本进行检测,结果见表10所示。通过本方法与德国西门子的试剂盒进行对比后发现:

[0213] (1) IgG4样品中外加IgG1、IgG2、IgG3,对本发明试剂盒的测定结果没有影响,且本发明试剂盒对IgG4有显著高于阴性血清的回收;

[0214] (2) 西门子公司IgG4试剂盒说明书标示的测定范围为0.055-3.3g/L,然而,在阴性血清中外加浓度为0.1g/L的IgG4时,德国西门子试剂盒所测结果与阴性血清值无差异,说明本发明涉及的试剂盒具有更高的灵敏度。

[0215] 表10本发明试剂盒与德国西门子试剂盒对人血清IgG4检测灵敏性的比较

样本	本发明	德国西门子	备注
阴性血清	0.061	0.67	
阴性血清加 IgG4 10 μ g	0.108	0.65	人 IgG4 终浓度为 0.1g/L
阴性血清加 IgG4 10 μ g 及 IgG1, IgG2 各 10 μ g	0.105	0.60	IgG1、IgG2、IgG4 的终浓度均为 0.1g/L
阴性血清加 IgG4 10 μ g 并加入 IgG1, IgG2, IgG3 各 10 μ g	0.110	0.48	IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的终浓度均为 0.1g/L

[0216] 实施例5. 本发明与现有技术的临床检测对比实验

[0217] 一. 材料和方法

[0218] 1. 材料

[0219] (1) 待测样本:49例正常人血清样本或临床诊断疑似IgG4-RD血清样本。血清样本由山西医科大学第一医院消化内科提供。采集人许翠萍、采集日期2017年3月到7月、采集人地址山西医科大学第一附属医院消化内科住院部、电话0351-4639020。收集全血并注意避免溶血,室温静置2小时或4 $^{\circ}$ C过夜后在3000~3500rpm/min离心10分钟,取上清即可进行测定。

[0220] (2) 本发明实施例1试剂盒,由山西瑞豪生物科技有限公司制备

[0221] (3) 待测样本寄送到山西迪安医学检验中心(第三方医学诊断机构),测定人IgG4

的含量并出具检测报告单。样本测值由第三方医学诊断机构完成,准确可靠。迪安使用的是德国西门子的免疫球蛋白G4测定试剂盒(散射比浊法)。

[0223] 2.方法

[0224] 使用本发明试剂盒与德国西门子公司产试剂盒分别测定49例正常人血清样本或临床诊断疑似IgG4-RD血清样本。

[0225] (1) 本发明试剂盒测定方法同实施例2方法,本发明方法为双单克隆抗体夹心ELISA法。

[0226] (2) 西门子公司试剂盒检测步骤参照该试剂盒说明书操作,德国西门子试剂盒为免疫散射比浊法。

[0227] 二.结果

[0228] 检测结果见表11。

[0229] 表11本发明试剂盒与德国西门子试剂盒对49例人血清样本的测定结果

样本编号	瑞豪 ELISA 测定结果	西门子散射比浊法 测定结果	两个结果比较
	阳性判定值 $\geq 0.212\text{g/L}$	阳性判定值 $\geq 2.01\text{g/L}$	
RH1	阳性 (0.26g/L)	阳性 (2.72g/L)	符合
RH2	阳性 (3.44g/L)	阳性 (19.2g/L)	符合
RH3	阴性 (0.056g/L)	阴性 (0.75g/L)	符合
RH4	阴性 (0.05g/L)	阴性 (0.27g/L)	符合
[0230] XC-62	阴性 (0.182g/L)	阳性 (2.74g/L)	不符合
XC-45	阴性 (0.197g/L)	阳性 (2.06g/L)	不符合
XC-11	阴性 (0.122g/L)	阴性 (0.85g/L)	符合
XC-27	阴性 (0.131g/L)	阴性 (0.75g/L)	符合
XC-3	阴性 (0.134g/L)	阴性 (1.12g/L)	符合
XC-53	阴性 (0.138g/L)	阴性 (1.58g/L)	符合
XC-102	阴性 (0.139g/L)	阴性 (1.05g/L)	符合
XC-61	阴性 (0.141g/L)	阴性 (1.9g/L)	符合

[0231]

XC-33	阴性 (0.142g/L)	阴性 (0.91g/L)	符合
XC-2	阴性 (0.158g/L)	阴性 (0.98g/L)	符合
XC-39	阴性 (0.158g/L)	阴性 (0.89g/L)	符合
XC-88	阴性 (0.169g/L)	阴性 (1.65g/L)	符合
G4-230	阴性 (0.173g/L)	阴性 (1.53g/L)	符合
G4-98	阴性 (0.182g/L)	阴性 (1.98g/L)	符合
G4-115	阴性 (0.192g/L)	阳性 (2.74g/L)	不符合
G4-177	阴性 (0.194g/L)	阴性 (1.75g/L)	符合
G4-101	阳性 (0.229g/L)	阳性 (2.55g/L)	符合
G4-88	阳性 (0.213g/L)	阳性 (2.89g/L)	符合
G4-90	阴性 (0.123g/L)	阴性 (1.34g/L)	符合
G4-78	阴性 (0.128g/L)	阴性 (1.31g/L)	符合
G4-278	阴性 (0.138g/L)	阴性 (1.6g/L)	符合
G4-114	阴性 (0.14g/L)	阴性 (1.79g/L)	符合
G4-9	阴性 (0.143g/L)	阴性 (1.08g/L)	符合
G4-108	阴性 (0.148g/L)	阴性 (1.49g/L)	符合
G4-219	阴性 (0.164g/L)	阴性 (1.88g/L)	符合
G4-221	阴性 (0.166g/L)	阴性 (1.4g/L)	符合
G4-64	阴性 (0.17g/L)	阴性 (1.16g/L)	符合
G4-165	阳性 (0.25g/L)	阳性 (2.25g/L)	符合
G4-11	阳性 (0.284g/L)	阴性 (1.49g/L)	不符合
G4-28	阳性 (0.418g/L)	阳性 (2.68g/L)	符合
t-78	阴性 (0.182g/L)	阴性 (1.38g/L)	符合
Y1	阴性 (0.187g/L)	阴性 (1.69g/L)	符合

	Y20	阴性 (0.195g/L)	阴性 (0.91g/L)	符合
	T-74	阴性 (0.202g/L)	阴性 (1.43g/L)	符合
	G-58	阴性 (0.122g/L)	阴性 (0.97g/L)	符合
	G-18	阴性 (0.133g/L)	阴性 (0.97g/L)	符合
	G-44	阴性 (0.142g/L)	阴性 (1.1g/L)	符合
	F-7	阴性 (0.18g/L)	阴性 (1.69g/L)	符合
	F-9	阴性 (0.2g/L)	阴性 (1.72g/L)	符合
	F-37	阴性 (0.18g/L)	阴性 (1.83g/L)	符合
	F-8	阴性 (0.152g/L)	阴性 (1.37g/L)	符合
[0232]	F-29	阴性 (0.136g/L)	阴性 (1.37g/L)	符合
	LCX	阴性 (0.01g/L)	阴性 (0.1g/L)	符合
	FYM	阴性 (0.091g/L)	阴性 (0.8g/L)	符合
	ZWJ	阳性 (0.266g/L)	阳性确诊	符合
	总数: 阳性/阴性	49: 8/41	49: 10/39	
	两方法检测结果一致性和符合率	49 例样本中一致性结果为 45 例, 4 例为结果不一致。在 4 例不一致的样本中有 3 例经西门子试剂盒检测为阳性而本方法检测为阴性的样本均在本方法确定的接近阳性值范围内。因此虽然两方法的符合率为 91.8%, 但如果将这三例疑似阳性的计算在内, 符合率接近 98%。		

[0233] 本发明方法与德国西门子公司产试剂盒对49例人血清样本的测定结果的一致性为 91.8%，两方法对人血清IgG4检测的符合率接近98%。说明本发明方法与已在中国国家药监局验证注册的进口产品《免疫球蛋白G4测定试剂盒(散射比浊法)》具有实施对临床血清样本IgG4检测的等效性。

[0234] 上文所列出的一系列的详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施方式的具体说明,它们并非用以限制本发明的保护范围,本领域技术人员可以设计出很多其他的修改和实施方式,这些修改和实施方式将落在本申请公开的原则范围和精神之内。更具体地说,在本申请公开、附图和权利要求的范围内,可以对主题组合布局的组成部件和/或布局进行多种变型和改进。除了对组成部件和/或布局进行的变型和改进外,对于本领域技术人员来说,其他的用途也将是明显的。

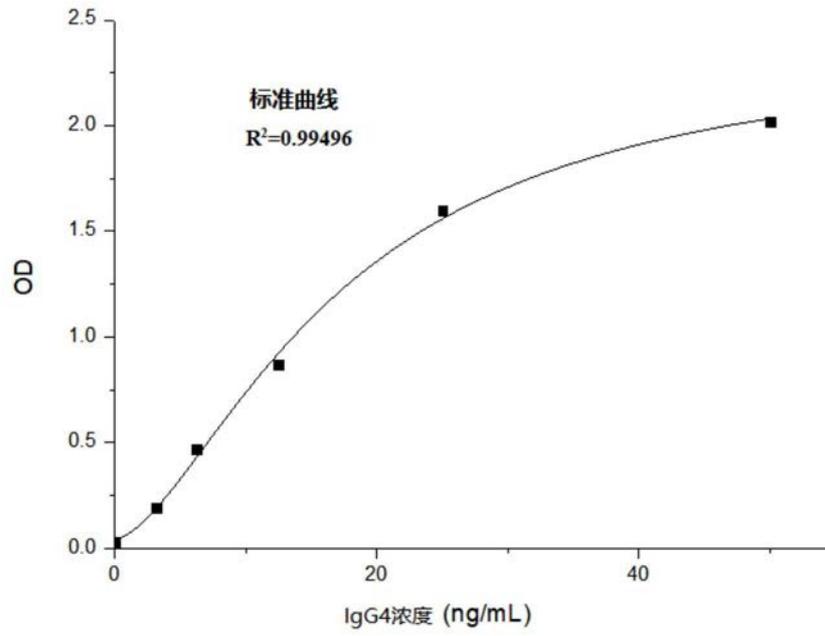


图1

稀释样本的IgG4浓度线性回归分析

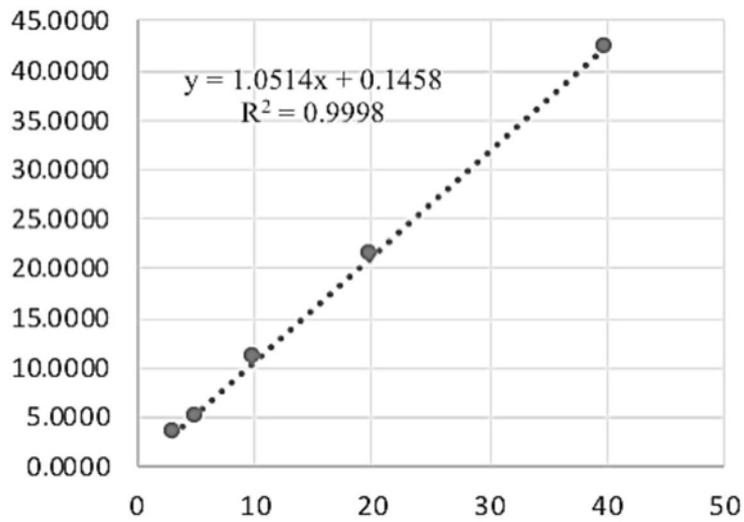


图2

专利名称(译)	一种检测人免疫球蛋白G4的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN110297093A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201910205576.4	申请日	2019-03-18
[标]发明人	王敏兰 牛林茹 陈婷婷 阎婧 杨武		
发明人	王敏兰 牛林茹 陈婷婷 张旋旋 奚瑞芳 阎婧 杨武		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/545 G01N33/6854		
代理人(译)	李欣		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测人免疫球蛋白G4的方法和试剂盒，属于医学检验技术领域。一种检测样本中人免疫球蛋白G4(IgG4)的方法，使用了两个高特异性抗IgG4Fc片段的单克隆抗体，第一个对IgG4特异的单克隆抗体与固相载体结合，第二个对IgG4特异的单克隆抗体被一种过氧化酶标记。通过与待测样本中IgG4的桥联作用形成第一IgG4单克隆抗体-IgG4-酶标第二IgG4单克隆抗体的复合物并固定与固相载体上。本发明采用高效清洗液去除样本中非特异性干扰物质成分。本发明对生物样本IgG4含量的检测方法实现了对生物样本中IgG4定量检测的高稳定性和高特异性，并准确定量待测物IgG4在人生物样本中的浓度。

