



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 204989188 U

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201520597737.6

(22) 申请日 2015.08.10

(73) 专利权人 广州市雷德生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市科学城揽月路  
80 号创新基地 D 区 701

(72) 发明人 楼建荣 肖维

(74) 专利代理机构 北京市盈科律师事务所

11344

代理人 马丽丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

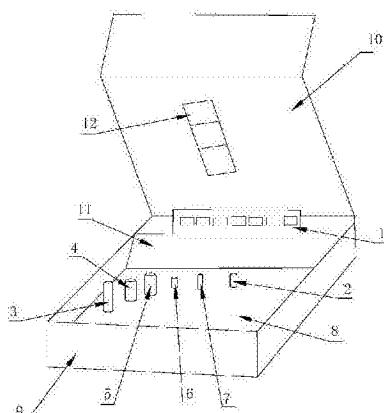
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 实用新型名称

评价机体免疫能力试剂盒

(57) 摘要

本实用新型涉及评价机体免疫能力试剂盒，包括盒子，盒子内可拆卸的安装酶标板、盒子内设有免疫能力评估卡、ATP 标准液瓶、10×ATP 标准液稀释液瓶、检测试剂 I 液瓶、检测试剂 II 液瓶、检测组分 A 液管和检测组分 B 液管。本实用新型评价免疫能力试剂盒以 ATP 作为生物标志物，可对细胞整体水平的免疫状态进行分析进而评估免疫性疾病患病风险。



1. 评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:包括盒子,盒子内可拆卸的安装酶标板、盒子内设有免疫能力评估卡、ATP 标准液瓶、 $10 \times$ ATP 标准液稀释液瓶、检测试剂 I 液瓶、检测试剂 II 液瓶、检测组分 A 液管和检测组分 B 液管。
2. 根据权利要求 1 所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述盒子包括盒体、顶盖以及泡沫板;盒体内安装泡沫板和酶标板,泡沫板上开设有试剂瓶的安装孔。
3. 根据权利要求 2 所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述 ATP 标准液瓶、 $10 \times$ ATP 标准液稀释液瓶、检测试剂 I 液瓶、检测试剂 II 液瓶、检测组分 A 液管和检测组分 B 液管安放在安装孔内。
4. 根据权利要求 2 所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述盒体内设有隔板,隔板位于泡沫板和酶标板之间。
5. 根据权利要求 1 所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述酶标板为 96 孔不透明酶标板。
6. 根据权利要求 2 所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述免疫能力评估卡设置于顶盖内表面或泡沫板上。
7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述免疫能力评估卡根据 ATP 浓度对应设有免疫能力低下、免疫能力正常和免疫能力超常三档。
8. 根据权利要求 7 所述的评价机体免疫能力试剂盒,其特征在于:所述免疫能力低下档对应 ATP 浓度  $< 150\text{ng/mL}$ ;免疫能力正常档对应  $150\text{ng/mL} \leq \text{ATP 浓度} < 500\text{ng/mL}$ ,免疫能力超常档对应 ATP 的浓度  $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

## 评价机体免疫能力试剂盒

### 技术领域

[0001] 本实用新型涉及生物领域,特别是涉及 ATP 作为生物标志物用于评价免疫能力的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 机体担负免疫功能的物质基础是免疫系统 (immune system)。免疫系统由免疫组织与器官、免疫细胞和免疫分子组成。免疫系统可分为天然免疫系统 (即非特异性免疫系统) 和获得性免疫系统 (即特异性免疫系统)。获得性免疫系统一般可以分成两大类:体液免疫和细胞免疫。体液免疫主要涉及人体内可以与各种外源抗原结合的抗体,它们是一类大分子蛋白质,也称作免疫球蛋白,包括 IgG、IgA、IgM 和 IgD、IgE 五种类型。细胞介导的免疫反应 (cell-mediated immunity, CMI) 主要涉及两大类细胞 :B 细胞和 T 细胞,T 细胞还可以分成 CD4 细胞和 CD8 细胞等;从功能上简单地说, B 细胞可以产生各种抗体,而 T 细胞本身就能杀死或吞噬进入体内的各种病原体。

[0003] 如果 Ig 量降低或者 B 细胞、T 细胞数目降低或功能异常 (特别是 CD4、CD8 细胞) 都提示可能存在免疫力下降。“免疫力下降”指的就是体内抗体水平降低或者 T、B 细胞功能降低,使得人体容易发生各种感染。劳累、营养不良、慢性疾病 (例如结核病、肝炎、恶性肿瘤、糖尿病)、艾滋病、药物 (如化疗药或免疫抑制剂) 等都会引起机体免疫力下降。免疫力低下的身体易于被感染或患癌症;免疫力超常也会产生对身体有害的结果,如引发过敏反应、自身免疫疾病等。因此,准确检测机体免疫力高低具有重要的现实意义。

[0004] 目前检测机体免疫能力的技术主要有:1. 淋巴细胞增殖检测技术 :淋巴细胞前体没有任何效应功能,但在遇到抗原刺激时可以增殖,淋巴细胞增殖是评估机体免疫能力的一种重要方法。目前临幊上常用的检测淋巴细胞增殖的方法有  $^{3}\text{H}$ -TdR 掺入法, MTT 法以及流式细胞仪检测法。2. T 细胞分泌功能测定技术 :体外培养的 T 细胞经各种丝裂原或抗原刺激后,分泌各种细胞因子,通过检测各细胞因子含量,生物学活性或基因表达水平,以反映 T 细胞功能。常用的检测方法有 Elisa、Elisop 和 PCR/RT-PCR。3. T 细胞介导的细胞毒活性测定技术 :细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs) 是 T 细胞在体内或体外经抗原刺激后产生的一种效应细胞,可特异性裂解靶细胞,这种能力可以反映机体的抗肿瘤能力,因此细胞毒活性检测可以反映机体的免疫能力。常用的方法有铬释放检测和 LDH 释放检测。

[0005] 但是现有免疫力检测方法具有如下问题:1. 淋巴细胞增殖检测技术的缺陷 : $^{3}\text{H}$ -TdR 掺入法它表示的是某一定量培养液中细胞的 DNA 合成总量,而不是特异性 T 细胞的试剂数目,会受体外培养条件影响,还存在放射性核素污染污染问题;MTT 方法受实验条件影响很大,培养体系需要严格控制;流式细胞技术分析需要一定的设备条件及所需实验时间周期较长。2. T 细胞分泌功能测定技术的缺陷 :Elisa 方法和 Elispot 方法操作较繁琐检测所需时间较长,检测的 T 细胞必须能分泌目标细胞因子;PCR/RT-PCR 存在假阳性和假阴性的结果,得到的不一定就是目的片段,操作严格否则易污染,最重要的是常规的 PCR 检测不出潜伏性的目的片段。3. T 细胞介导的细胞毒活性测定技术的缺陷 :铬有放射性,不利于

安全操作和废物处置以及不是定量分析且操作步骤多 ;LDH 是细胞本身代谢的产物,可能存在自发释放现象,且效应细胞作用于靶细胞后也会有损伤,同样会释放 LDH,从而影响细胞毒活性测定的精确性。目前市场上所有相关的产品及检测手段均不能对患者的治疗效果进行有效的分析与评估,并且对于 HIV 病人或免疫能力低下者均不能适用。因此,提供一种免疫力强弱的检测装置具有现实意义。

## 实用新型内容

- [0006] 有鉴于此,有必要针对上述的问题,提供一种评价机体免疫能力试剂盒。
- [0007] 本实用新型通过以下技术方案实现上述目的 :
- [0008] 评价机体免疫能力试剂盒,包括盒子,盒子内可拆卸的安装酶标板、盒子内设有免疫能力评估卡、ATP 标准液瓶、 $10 \times$ ATP 标准液稀释液瓶、检测试剂 I 液瓶、检测试剂 II 液瓶、检测组分 A 液管和检测组分 B 液管。
- [0009] 优选地,所述盒子包括盒体、顶盖以及泡沫板;盒体内安装泡沫板和酶标板,泡沫板上开设有试剂瓶的安装孔。
- [0010] 优选地,所述 ATP 标准液瓶、 $10 \times$ ATP 标准液稀释液瓶、检测试剂 I 液瓶、检测试剂 II 液瓶、检测组分 A 液管和检测组分 B 液管安放在安装孔内。
- [0011] 优选地,所述盒体内设有隔板,隔板位于泡沫板和酶标板之间。
- [0012] 优选地,所述酶标板为 96 孔不透明酶标板。
- [0013] 优选地,所述免疫能力评估卡设置于顶盖内表面或泡沫板上。
- [0014] 优选地,所述免疫能力评估卡根据 ATP 浓度对应设有免疫能力低下、免疫能力正常和免疫能力超常三档。
- [0015] 优选地,所述免疫能力低下档对应 ATP 浓度  $< 150\text{ng/mL}$ ;免疫能力正常档对应  $150\text{ng/mL} \leqslant \text{ATP 浓度} < 500\text{ng/mL}$ ,免疫能力超常档对应 ATP 的浓度  $\geqslant 500\text{ng/mL}$ 。
- [0016] 三磷酸腺苷 (ATP) 在生物体的生命活动中发挥着重要作用。血清免疫球蛋白的合成以及分泌乃至发挥功能的过程都需要 ATP 的参与;另一方面 T 细胞发挥功能来杀死或吞噬进入体内的各种病原体也需要 ATP 提供能量; $\text{Ca}^{2+}$ 、DAG 等第二信使对于免疫信号通路的传导以及放大起着必不可少的作用,但它们的合成分泌以及跨膜运输都需要 ATP;此外 ATP 产生后会分泌到胞外,与其受体结合,进而激活第二信使,进行信号转导。
- [0017] 本实用新型评价机体免疫能力试剂盒的检测原理为:萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase) 能高效利用 ATP,催化底物荧光素反应产生荧光 (检测波长为 562nm)。当荧光素酶和荧光素都过量时,在一定的浓度范围内产生的荧光与 ATP 的浓度成很好的线性依赖关系,并具有较高的敏感性。ATP 浓度的高低和样品免疫能力强弱呈正相关,酶标仪检测分析确定免疫能力强弱。因此,细胞的三磷酸腺苷 (ATP) 值的测定对于检测机体免疫能力具有重要的临床意义,对免疫能力做出客观的评估,进而能够提早预防感染,及早进行干预治疗免疫性疾病,又能检测治疗恢复的效果。
- [0018] 与现有技术相比,本实用新型具有如下有益效果 :
- [0019] 本实用新型评价免疫能力试剂盒以 ATP 作为生物标志物,可对细胞整体水平的免疫状态进行分析进而评估免疫性疾病患病风险,通过对个体免疫状态诊断评估进行分类:高危易感者,中危易感者以及低危易感者,根据免疫状态以及疾病的特异性诊断,能更有效

对患者进行个体化诊断和治疗,也能有效的控制疾病人群,为免疫性疾病患者筛查提供一种新的、费用低的、个体化的快速检测手段。本实用新型适用于 HIV 病人或免疫能力低下者更具有整体性与说服力;还可以通过测定同一患者不同疾病阶段的 ATP 浓度,对患者的治疗效果进行有效的分析与评估。

## 附图说明

[0020] 图 1 为本实用新型其中一个实施例的结构示意图。

[0021] 附图标记说明:

[0022] 1-白色不透明酶标板,2-标准液瓶,3-10×标准液稀释液瓶,4-检测试剂 I 液瓶,5-检测试剂 II 液瓶,6-检测组分 A 液管,7-检测组分 B 液管,8-泡沫板,9-盒体,10-顶盖,11-隔板,12-免疫能力评估卡。

## 具体实施方式

[0023] 为了便于本领域技术人员理解,下面将结合附图以及实施例对本实用新型进行进一步描述。本实施例中使用的试剂及仪器都是市售产品。

[0024] 图 1 所示为本实用新型评价机体免疫能力试剂盒一个实施例的结构示意图。所述评价机体免疫能力试剂盒结构包括盒子、盒子内可拆卸的安装酶标板 1、盒子内设有免疫能力评估卡 12、ATP 标准液瓶 2、10×ATP 标准液稀释液瓶 3、检测试剂 I 液瓶 4、检测试剂 II 液瓶 5、检测组分 A 液管 6、检测组分 B 液管 7。其中,所述 ATP 标准液瓶 2、10×ATP 标准液稀释液瓶 3、检测试剂 I 液瓶 4、检测试剂 II 液瓶 5 均为白色瓶,检测组分 A 液管 6 为白色管,检测组分 B 液管 7 为棕色管。所述酶标板 1 为 96 孔白色不透明酶标板。

[0025] 优选地,所述免疫能力评估卡 12 根据 ATP 浓度对应设有免疫能力低下、免疫能力正常和免疫能力超常三档。所述免疫能力低下档对应 ATP 浓度  $< 150\text{ng/mL}$ ;免疫能力正常档对应  $150\text{ng/mL} \leq \text{ATP 浓度} < 500\text{ng/mL}$ ,免疫能力超常档对应 ATP 的浓度  $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0026] 具体的,所述盒子包括泡沫板 8、隔板 11、盒体 9 以及顶盖 10。盒体 9 内空间被隔板 11 分为两部分,一部分安装泡沫板 8,另一部分可拆卸的安装酶标板 1,隔板 11 位于泡沫板 8 和酶标板 1 之间。所述泡沫板 8 上开设有用于安放试剂瓶的安装孔,用于安放 ATP 标准液瓶、10×ATP 标准液稀释液瓶、检测试剂 I 液瓶、检测试剂 II 液瓶、检测组分 A 液管和检测组分 B 液管。顶盖 10 内表面设置免疫能力评估卡 12。

[0027] 本实施中各检测试剂及检测组分的组成如下:

[0028] 检测试剂 I 包含 25mmol/L 双甘氨肽 (glycylglycine, pH7.8), 5.4mmol/L MgSO<sub>4</sub>。

[0029] 检测试剂 II 为 0.15mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液,包含 0.15mol/L 甘氨酸,1mmol/L EDTA, 1mg/mL 牛血清白蛋白,1mol/L NaOH 溶液, pH7.8。

[0030] 检测组分 A 为 10 μL 荧光素酶 (luciferase)。

[0031] 检测组分 B 为 0.086mmol/L 荧光素 (D-Luciferin)。

[0032] 使用本实用新型的检测方法为:

[0033] (1) 室温解冻检测组分 A 和检测组分 B,解冻完全后放置于冰上;将其他各种试剂从冰箱取出平衡至室温。

[0034] (2) 37°C 完全溶解检测试剂 I 和检测试剂 II,按照 1:1 的比例取出配成 1× 中间溶

液 (1× Intermediate Solution), 混匀, 置于室温, 1× 中间溶液需现配现用。

[0035] (3) 按照每 10mL 的 1× 中间溶液需加入 50 μl 检测组分 A 和 30 μl 检测组分 B 的用量关系配制工作液。

[0036] (4) 用纯水将 10×ATP 标准稀释液稀释成 1×ATP 标准稀释液, 并加入 0.35g/L 的 NaHCO<sub>3</sub>。

[0037] (5) 用 1×ATP 标准稀释液将校准品液梯度稀释至 1mM、0.1mM、0.01mM、0.001mM、0.0001mM、0mM 的工作标准液。

[0038] (6) 将待检测样品 (细胞或上清) 及梯度稀释后的工作校准液加入到可以用于荧光素酶信号检测的 96 孔不透明白色酶标板中, 每孔加入样品 80 μL。

[0039] (7) 加入等体积的工作液到细胞培养基或上清样品及梯度稀释后的校准品中, 室温 (~ 22°C) 温育 1h。

[0040] (8) 用酶标仪扫读荧光值, 检测波长为 562nm, 将 0mM 的校准品设为空白对照孔, 获得 ATP 浓度。

[0041] (9) 根据 ATP 的浓度, 获得免疫能力的强弱, 分析其易感程度。

[0042] 本实施例中样品为从外周血中经 Ficoll 法或磁珠法分离获得的细胞, 具体方法如下:

[0043] 1) Ficoll 法分离细胞

[0044] 取一支 15mL 锥底管, 加入 6~9mL PBS 或 RPMI1640, 加入 3~6mL 外周血血样, 混匀; 另取一支新的 15mL 锥底管, 加入 3~6mL Ficoll 分离液, 在小心将稀释的外周血血样加到 Ficoll 上层, 使分层清晰; 在小于等于 1000g、25°C 条件下离心 20 至 40min, Brake 调成 0; 将上层血浆转移至一支新的 1.8mL 冻存管中, -80°C 保存; 吸出血浆至白色分层 (即单核细胞层) 上约 0.5~1cm 处即可; 小心转移 PBMCs 至一支新的 1.5mL 离心管; 在小于等于 1000g, 20°C~25°C 条件下离心 4~10min, 加入 PBS 至总体积为 1mL 重悬细胞; 更换 PBS 重复此步骤洗涤 3 次。台盼蓝染色 1~5min 数细胞数量和存活率。

[0045] 2) 磁珠法分离细胞 (以 CD4 磁珠为例)

[0046] 取 125 μL 全血, 用 350 μL PBS 稀释, 加入 25 μL CD4 磁珠; 室温混匀 10min, 置于磁板上吸附 2min; 弃上清, 用 300 μL PBS 洗三遍即可。

[0047] 以上所述实施例仅表达了本实用新型的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但并不能因此而理解为对本实用新型专利范围的限制。应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本实用新型构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本实用新型的保护范围。因此, 本实用新型的保护范围应以所附权利要求为准。

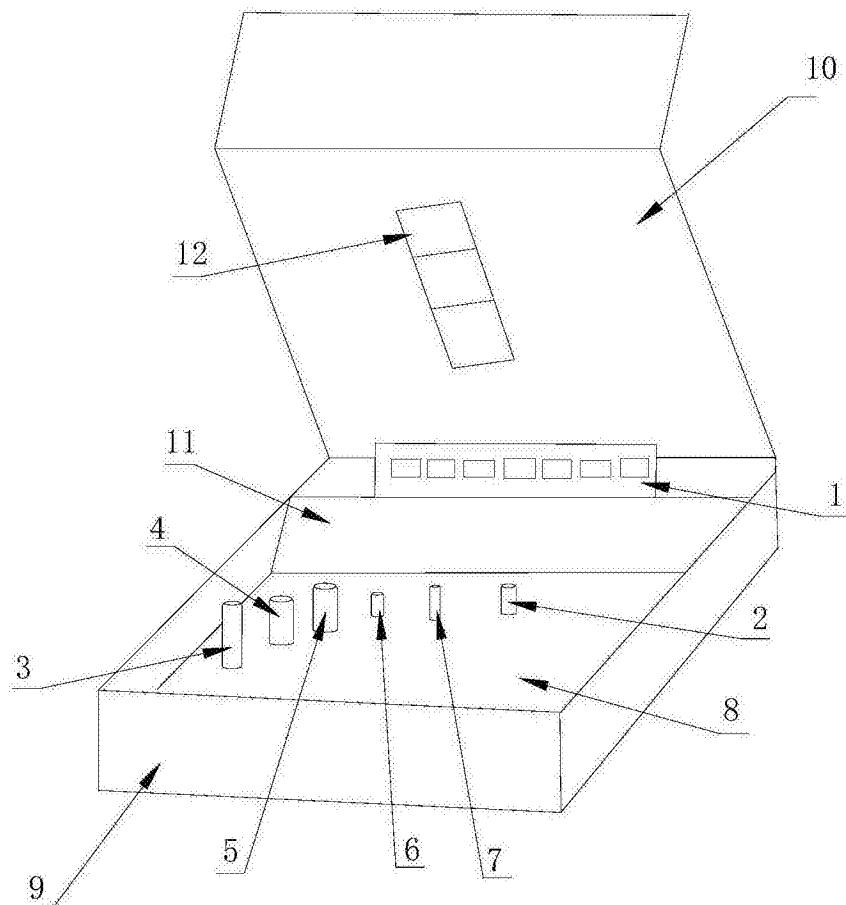


图 1

专利名称(译)	评价机体免疫能力试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN204989188U</a>	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201520597737.6	申请日	2015-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	广州市雷德生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市雷德生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市雷德生物科技有限公司		
[标]发明人	楼建荣 肖维		
发明人	楼建荣 肖维		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/533		
代理人(译)	马丽丽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本实用新型涉及评价机体免疫能力试剂盒，包括盒子，盒子内可拆卸的安装酶标板、盒子内设有免疫能力评估卡、ATP标准液瓶、10×ATP标准液稀释液瓶、检测试剂I液瓶、检测试剂II液瓶、检测组分A液管和检测组分B液管。本实用新型评价免疫能力试剂盒以ATP作为生物标志物，可对细胞整体水平的免疫状态进行分析进而评估免疫性疾病患病风险。

