



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110716055 A

(43)申请公布日 2020.01.21

(21)申请号 201910859184.X

(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 于洋 张蓓 李柳棚

李军普 黄伦辉 崔亚琼 闫娟娟

刘甫

(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 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

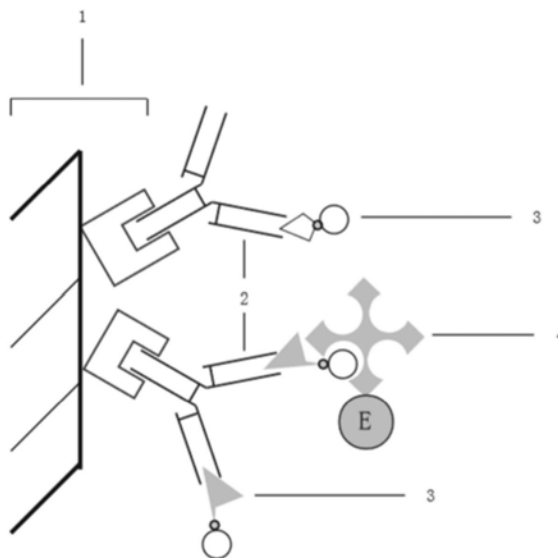
权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54)发明名称

过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒,包括如下试剂,重组人Fc ϵ RI- α 亚基、生物素标记生物信息表位混合溶液、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素以及生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体。本发明采用受体作为捕获分子,直接捕获与受体结合的sIgE分子;采用生物信息表位合成肽段作为已知抗原,是在亚分子(信息表位)水平上进一步精准检测具有致病活性的抗体,提示患者接触相应过敏原后,出现临床症状的危险性。



1. 生物素标记生物信息表位, 以及重组人FcεRI-α亚基在过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒中的应用。

2. 一种过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒, 其特征在于: 包括如下试剂, 重组人FcεRI-α亚基、生物素标记生物信息表位混合溶液、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素以及生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒, 其特征在于: 所述重组人FcεRI-α亚基包被在微孔板上; 优选的, 采用常规物理吸附方式包被; 优选的, 包被过程包括如下步骤: 首先, 用pH 9.6碳酸盐缓冲液溶解重组IgE-Fc受体, 浓度为3-10微克/毫升, 优选5微克/毫升; 125微升/孔; 室22-25℃) 放置4-6小时; 再转至2-8度冰箱, 过夜(大于16小时); 其次, 弃掉微孔板包被缓冲液, 加入含2%牛血清白蛋白(BSA)的0.1M pH 7.4磷酸盐缓冲液, 封闭空白位点, 250微升/孔; 置于2-8度冰箱内, 过夜(大于16小时); 最后, 弃掉封闭液, 甩干液体风干后塑料真空包装保存, 内置干燥剂。

4. 根据权利要求2所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒, 其特征在于: 所述生物素标记生物信息表位混合溶液的制备包括如下步骤, 首先, 合成生物信息表位肽段, 并于N端增加一个赖氨酸并标记生物素; 然后将各生物素标记短肽, 按等比例混合。

5. 根据权利要求2所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒, 其特征在于: 还包括显色底物、终止液以及洗液。

6. 根据权利要求5所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒, 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任一项所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒在制备过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂中的应用。

8. 如权利要求7所述的应用, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 向包被有重组人FcεRI-α亚基微孔板的检测孔中, 加入待检血清, 50微升/孔; 同时加入生物素标记的生物信息表位肽段混合液(R1)至微孔板, 50微升/孔; 制备标准曲线时, 加入校准品溶液, 50微升/孔, 同时加入生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体至微孔板, 50微升/孔。

2) 混匀, 37℃, 水浴1小时。

3) 用洗涤缓冲液, 洗板机洗涤5次, 甩干孔内液体。

4) 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(HRP-SA) (稀释比例, 1:8000) 于孔内, 100微升/孔。

5) 混匀, 37℃, 水浴0.5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(15-25℃)或37℃下避光温育10-30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。

过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫球蛋白E分析技术领域,尤其是涉及血清过敏原特异性IgE抗体致病活性检测试剂盒。

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,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。需要指出,sIgE抗体有多个层面的含义,以牛奶过敏患者为例,牛奶中存在多种蛋白,均有可能诱导患者产生抗体。针对任一种蛋白的抗体,称为此种蛋白的特异性IgE(sIgE)抗体;而临床有时将sIgE抗体也泛指一种食物的sIgE抗体。更严格讲,即使是一种蛋白质,一种过敏原分子,往往含义多种抗原表位,每种表位所针对的IgE抗体,是针对抗原表位水平的sIgE抗体(亚分子水平的单克隆抗体)。

[0003] 变态反应性疾病的临床诊断主要依靠病史和确认过敏原,而确认过敏原是临床诊断的重要环节。目前,临床实验室确认过敏原有生物学方法和免疫化学方法两大类。经典的生物学方法是皮肤点刺试验。“皮肤点刺试验(skin prick test,SPT)”是确定过敏原的体内试验。特定过敏原通过点刺进入受试者皮下,与受试者肥大细胞表面的sIgE抗体结合,启动脱颗粒过程,引起局部轻微症状如“风团”。此外,外周血嗜碱性粒细胞激活试验(basophil activation test,BAT)同样基于皮肤点刺试验的原理,体外模拟肥大细胞或嗜碱性粒细胞的激活过程,同样用于确认过敏原种类,同时也可以用于评估脱敏效果或者评估患者接触过敏原的风险程度。但是,需要明确指出,在变态反应性疾病的患者体内,过敏原sIgE抗体除分布于肥大细胞表面或嗜碱性粒细胞表面外,也分布于患者的血液中,呈游离状态,抽取外周血同样可检测到。为此,通过检测血清中过敏原sIgE抗体,同样是确认过敏原的种类重要方法,被临床广泛采用,即用已知过敏原(抗原),检测特异性抗体(sIgE)的方式,此种方式称为免疫化学方法。免疫化学方法基于抗原抗体特异性结合的原理,虽说是过敏原检测,但实际上是通过检测sIgE抗体,间接推理致使患者过敏的过敏原种类。免疫化学方法有荧光酶免疫试验、斑点酶联免疫试验、酶联免疫吸附试验等,其中荧光酶免疫试验是血清过敏原sIgE抗体检测的金标准。

[0004] 体外血清过敏原sIgE抗体是临床采用实验诊断方法,“ImmunoCAP”被公认为血清sIgE抗体检测的金标准方法。“Immuno CAP”基于荧光酶免疫分析方法,采用高吸附活性材

料包被过敏原组分(已知抗原),称为“CAP”抗原;与血清标本温浴时,过敏原sIgE抗体与之结合形成已知抗原-sIgE抗体复合物;加入半乳糖苷酶标记的二抗(羊抗人IgE抗体),与人sIgE抗体结合形成复合物;洗涤分离过剩的标记抗体,加入荧光底物出现荧光信号。20世纪80年代后期,随着DNA技术的发展和运用,无论是吸入过敏原(空气过敏原),还是食入过敏原(食品过敏原),各种过敏原分子(蛋白水平)被不断识别和克隆,多种过敏性疾病的致病因素也在不断被解析,血清过敏原sIgE抗体进入分子诊断新阶段。所谓分子诊断(molecular allergy diagnostics,MA),又称过敏原单组分诊断(component-resolved diagnosis,CRD),即在单一蛋白分子水平上检测血清中单一一种过敏原(蛋白质)sIgE抗体的诊断方法。

[0005] 然而,从sIgE分析方法层面,生物活性检测与免疫化学检测方法有很大区别。嗜碱性粒细胞激活试验(BAT),基于细胞生物学方法,模拟体内真实的致敏细胞的激活过程,检测对象是结合于细胞表面的“结合型”抗体,更重要的是能够鉴别过敏原sIgE抗体与抗原表位的结合能力(亲和性),高亲和性抗体具有更强的桥联过敏原的能力,显示更高激活嗜碱性粒细胞的能力。临床应用表明,BAT能够定量分析嗜碱性粒细胞的活化程度和功能状态,已广泛用于特异性脱敏治疗的效果评估、接触疑似食物风险评估等等。BAT基于细胞生物学方法,致敏细胞表面的过敏原sIgE抗体通过结合抗原表位(高亲和性表位)来桥联过敏原分子,无论采用食物蛋白粗取液,或重组过敏原作为刺激物,均能获得满意检测结果。

[0006] 基于医学免疫学基本理论,血清过敏原sIgE抗体致病活性是由抗体分子与抗原表位之间的亲和性决定的,亲和性直接决定sIgE“捕获”、“桥联”过敏原、“活化”致敏细胞的能力,而目前采用完整蛋白为已知抗原,其结果是一组针对此抗原分子不同抗原表位的多克隆抗体的混合物,而不能精准鉴别其中的高亲和性抗体。如今,过敏原研究已深入至亚分子水平,即抗原表位水平,越来越多过敏原的抗原表位被解析,关于过敏原sIgE抗体所针对的抗原表位特征研究结果,显示出令人振奋的临床价值。抗原表位是免疫细胞识别的基本单位,同样也是血清sIgE抗体识别的基本单位,更重要的是致敏细胞表面sIgE抗体桥联过敏原能力,与抗原表位的结合能力密切相关。

[0007] 综上所述,无论采用蛋白粗提物作为已知抗原(混合蛋白)的传统意义的过敏原sIgE抗体的检测,还是基于单一过敏原(单一蛋白)sIgE抗体的分子诊断(CRD),二者均不能鉴别不同致病活性过敏原sIgE抗体,不能实现过敏原sIgE抗体的精准检测,给临床诊断带来某些困惑。

发明内容

[0008] 本发明是针对目前过敏原sIgE抗体检测不能反映抗体致病活性的缺陷,提出一种过敏原特异性免疫球蛋白E抗体致病活性检测试剂盒。

[0009] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0010] 本发明提供生物素标记过敏原生物信息表位(多肽)和重组人FcεRI-α亚基在过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒中的应用。

[0011] 本发明同时提供一种过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒,包括如下试剂,重组人FcεRI-α亚基、生物素标记生物信息表位混合溶液、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素以及生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体。

[0012] 优选的,所述重组人FcεRI-α亚基包被在微孔板上;优选的,采用常规物理吸附方式包被;优选的,包被过程包括如下步骤:首先,用pH 9.6碳酸盐缓冲液溶解重组IgE-Fc受体,浓度为3-10微克/毫升,优选5微克/毫升;125微升/孔;室22-25℃)放置4-6小时;再转至2-8度冰箱,过夜(大于16小时);其次,弃掉微孔板包被缓冲液,加入含2%牛血清白蛋白(BSA)的0.1M pH 7.4磷酸盐缓冲液,封闭空白位点,250微升/孔;置于2-8度冰箱内,过夜(大于16小时);最后,弃掉封闭液,甩干液体风干后塑料真空包装保存,内置干燥剂。

[0013] 优选的,所述生物素标记生物信息表位混合溶液的制备包括如下步骤,首先,合成生物信息表位肽段,并于N端增加一个赖氨酸并标记生物素;然后将各生物素标记短肽,按等比例混合。

[0014] 优选的,还包括显色底物、终止液以及洗液。

[0015] 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。

[0016] 本发明也提供如上所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒在制备过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂中的应用。

[0017] 优选的,包括以下步骤:

[0018] 1) 向包被有重组人FcεRI-α亚基微孔板的检测孔中,加入待检血清,50微升/孔;同时加入生物素标记的生物信息表位肽段混合液(R1)至微孔板,50微升/孔;制备标准曲线时,加入校准品溶液,50微升/孔,同时加入生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体至微孔板,50微升/孔。

[0019] 2) 混匀,37℃,水浴1小时。

[0020] 3) 用洗涤缓冲液,洗板机洗涤5次,甩干孔内液体。

[0021] 4) 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(HRP-SA)(稀释比例,1:8000)

[0022] 于孔内,100微升/孔。

[0023] 5) 混匀,37℃,水浴0.5小时。

[0024] 6) 重复“3”。

[0025] 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

[0026] (或A、B液先混合再加入孔中,100微升/孔),轻轻混匀,在室温(15-25℃)

[0027] 或37℃下避光温育10-30分钟,直至显色至预期深浅。

[0028] 8) 加入终止液至孔内终止反应,50微升/孔,蓝色变为黄色。

[0029] 9) 使用酶标仪于30分钟内于450nm处测定吸光值。

[0030] 检测原理:过敏原特异性免疫球蛋白E(sIgE)是一种针对某一特定过敏原组分(单组份过敏原)的免疫球蛋白E抗体。本发明所述具有致病活性的过敏原sIgE抗体,是指那些与肥大细胞或嗜碱性粒细胞相应受体结合的抗体,此类抗体与单组份过敏原相应的抗原表位具有较高的亲和力,所对应的抗原表位,本发明中称之为“生物信息表位”。由于此类抗体与过敏原具有较高亲和力,容易结合过敏原分子表面的生物信息表位形成抗原桥,从而启动致敏细胞脱颗粒程序,释放组织胺等生物介质,引起过敏性疾病的相关症状,因此检测此类抗体可反映致病活性。

[0031] 本发明的试剂盒的检测方法具备两个特征:其一,采用重组IgE-Fc受体(FcεRI-α亚基)包被的96孔板,直接捕获亲细胞性sIgE抗体(Cyto-sIgE);其二,是采用一组生物素标

记的生物信息学表位合成肽段(也可采用由生物素标记的生物信息表位的重组融合蛋白)作为抗原,这些抗原能够直接识别高亲合性sIgE抗体(致病活性抗体)。在上述条件下,将待检血清加入微孔内,同时加入生物素标记的生物信息表位合成肽段,表示为“Bio-E₁, Bio-E₂, …… Bio-E_n”;温浴,待检致病活性抗体一方面与微孔板表面的重组IgE-Fc受体结合,另一方面与生物素标记的生物信息表位合成肽段结合。洗涤微孔,再加入辣根过氧化物酶标记的亲合素(HRP-SA),温浴,酶标亲合素与生物素结合。洗涤微孔,加入底物显色,加终止液终止酶促反应,用酶标仪读取光密度值(OD)。光密度值与待检标本中sIgE致病活性呈正相关。

[0032] 相对于现有技术,本发明所述的过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒,具有以下优势:

[0033] 采用受体作为捕获分子,直接捕获与受体结合的sIgE分子;采用生物信息表位合成肽段作为已知抗原,是在分子水平上进一步精准检测具有致病活性的抗体,提示患者接触过敏原后,出现临床症状的危险性。

附图说明

[0034] 图1为本发明的检测原理图;

[0035] 1、FcεR-I型α亚基包被微孔板(Well-FcR);2、待检sIgE抗体(针对生物信息表位)(E-sIgE);3、生物标记生物信号表位(合成多肽)(Bio-E);4、辣根过氧化物酶标记链霉亲合素(HRP-SA)。

[0036] 图2为本发明实施例一中得到的校准曲线;

[0037] 图3为外周血嗜碱粒细胞的圈选;

[0038] 图4为外周血嗜碱粒细胞接受牛奶过敏原刺激后活化百分比;

[0039] 图5为生物信息表位相关的sIgE与单组份(OVA)-sIgE抗体彼此相关性($R^2=0.44$)

[0040] 图6为生物信息表位相关的sIgE与外周血BAT活性结果彼此相关性($R^2=0.722$)。

具体实施方式

[0041] 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。

[0042] 下面结合实施例来详细说明本发明。

[0043] 实施例一

[0044] 一种过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒,包括如下试剂:

[0045] 重组IgE-Fc受体(FcεRI-α亚基),商业购买,信息如下:重组人Fc epsilon RI/FcεR1A蛋白,即重组IgE-Fc受体(FcεRI-α亚基);品牌:Abcam;货号:ab114334;

[0046] 重组人FcεRI-α亚基包被在微孔板上,采用常规物理吸附方式包被,包括以下步骤,首先,用pH 9.6碳酸盐缓冲液溶解重组IgE-Fc受体,浓度为5微克/毫升;125微升/孔;室温(22-25度)放置4-6小时;再转至2-8度冰箱,过夜(大于16小时)。其次,弃掉微孔板包被缓冲液,加入含2%牛血清白蛋白(BSA)的0.1M pH 7.4磷酸盐缓冲液,封闭空白位点,250微升/孔;置于2-8度冰箱内,过夜(大于16小时)。最后,弃掉封闭液,甩干液体风干后塑料真空

包装保存,内置干燥剂。

[0047] 生物素标记生物信息表位混合溶液(R1);

[0048] 生物信息表位筛选:采用生物信息学并结合文献报道,筛选确定某个单一过敏原的生物信息表位。

[0049] 如,卵类粘蛋白(OVA)是蛋清重要过敏原组分,共选定5个生物信息表位,如下:

[0050] 1# 9-20 PNATDKEGKDVL

[0051] 2# 31-44 GTDGVITYTNDCLLC

[0052] 3# 46-59 YSIEFGTNISKEHD

[0053] 4# 101-114 TYDNECLLCAHKVE

[0054] 5# 175-186 NGTLTSLSHFGKC

[0055] 生物信息表位合成:采用人工合成方式,合成上述生物信息表位肽段,于N端增加一个赖氨酸并标记生物素。

[0056] 制备生物素标记生物信息表位混合溶液(R1):将上述生物素标记短肽,按等比例混合,每种短肽的蛋白浓度为5微克/毫升,稀释缓冲液为0.1M pH 7.2PBS,含5%牛血清白蛋白(BSA)。

[0057] 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(R2),商业化购买,稀释工作浓度,1:8000,稀释缓冲液为0.1M pH 7.2PBS,含5%牛血清白蛋白(BSA)。品牌:Invitrogen;货号:SA100-01;

[0058] 显色底物(TMB-H₂O₂溶液)(R3),双组分TMB显色液;品牌:Solarbio;货号:PR1210;

[0059] 洗液(R4)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;

[0060] 稀硫酸溶液(终止液)(R5),ELISA终止液;品牌:Solarbio;货号:C1058。

[0061] sIgE校准品溶液(C1-C6);

[0062] 生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体(R6),商业化购买,稀释工作浓度,1:5000,稀释缓冲液为0.1M pH 7.2PBS,含5%牛血清白蛋白(BSA);品牌:Invitrogen

[0063] 货号:A18797。

[0064] 已知浓度校准品溶液,用于绘制校准曲线,或形成数学函数。

[0065]

序号	浓 度 (KU/L)
1	0.00
2	0.35
3	0.70
4	5
5	20
6	80

[0066] 本检测方法为定量分析,需要sIgE校准曲线或数学函数。为适应多种组分sIgE定

量的需要,本方法参照Immuno-CAP商品化sIgE抗体检测试剂盒的定量方法进行。具体是用重组IgE-Fc受体I型 α 亚基包被酶标板(与sIgE致病活性检测相同,即上文已介绍的酶标反应板)加入系列校准品和生物素标记的羊抗人IgE多克隆抗体,温浴,校准品IgE结合IgE Fc受体和生物素标记抗人IgE多克隆抗体,形成受体-IgE-标记抗体复合物;洗涤微孔板,再依次加入辣根过氧化物酶链霉亲合素,温浴;洗涤后,再加入显色底物,终止显色,酶标仪读数。

[0067] 检测前,所有试剂和样本提前取出,微孔板取出,室温静置30分钟以上。

[0068] 检测包括以下步骤:

[0069] 1) 向包被有重组人Fc ϵ RI- α 亚基微孔板的检测孔中,加入待检血清,50微升/孔;同时加入生物素标记的生物信息表位肽段混合液(R1)至微孔板,50微升/孔。

[0070] 校准曲线,加入校准品溶液(C1-C6),50微升/孔,同时加入生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体(R6)至微孔板,50微升/孔。

[0071] 2) 混匀,37℃,水浴1小时。

[0072] 3) 用洗涤缓冲液,洗板机洗涤5次,甩干孔内液体。

[0073] 以下步骤测试孔和校准曲线孔完全相同。

[0074] 4) 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲合素(HRP-SA)(稀释比例,1:8000)于孔内,100微升/孔。

[0075] 5) 混匀,37℃,水浴0.5小时。

[0076] 6) 重复“3)”。

[0077] 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(15-25℃)或37℃下避光温育10-30分钟,直至显色至预期深浅。

[0078] 8) 加入终止液至孔内终止反应,50微升/孔,蓝色变为黄色。

[0079] 9) 使用酶标仪于30分钟内在450nm处测定吸光值。

[0080] 校准曲线如图2所示。

[0081] 标准曲线测定值

[0082]

校准品		OD-1	OD-2	均值
序号	浓度 (KIU/L)			
1	0	0.012	0.09	0.051
2	0.35	0.121	0.117	0.119
3	0.7	0.218	0.221	0.220
4	5	0.445	0.456	0.451
5	20	0.801	0.831	0.816
6	80	1.211	1.189	1.200

[0083] 为证实本发明的检测结果能够反映过敏原sIgE的致病活性,即和外周血嗜碱性粒细胞激活试验的结果相关,本发明将两种方法的结果进行相关分析。

[0084] 对比例外周血特异性过敏原嗜碱粒细胞激活试验 (BAT) 实验程序

[0085] 特异性过敏原嗜碱粒细胞激活试验 (basophil activation tests, BATs) 使用特异性过敏原激发外周血嗜碱粒细胞活化并脱颗粒,采用流式细胞术 (Flow cytometry, FCM),通过荧光标记特异性抗体识别嗜碱粒细胞活化的标志物 (CD63),定量分析活化嗜碱粒细胞数量,可反映嗜碱粒细胞的活化程度和脱颗粒状态,对诊断过敏性疾病有重要价值。

[0086] 实验原理

[0087] 过敏患者体内嗜碱粒细胞处于致敏状态,即嗜碱粒细胞表面已结合特异性IgE分子;此时,致敏细胞如遇到相应过敏原,细胞表面的抗体与过敏原结合形成“抗原桥”,激发致敏细胞活化,细胞表面高度表达CD63分子。本发明以“ β -乳球蛋白 (Bos d 5) 过敏”为例:将待检患者的外周血与 β -乳球蛋白溶液混合温育。如患者对 β -乳球蛋白过敏,则嗜碱粒细胞活化并表达CD63分子;加入抗CD63-FITC/抗CD123-PE/抗HLA-DR PerCP荧光标记抗体并温育,离心弃上清,用流式细胞仪分析,通过设门选定嗜碱粒细胞 (CD123⁺、HLA-DR⁻),根据是否表达CD63分子,即可判断待检患者嗜碱粒细胞被牛奶活化的百分比。

[0088] 主要试剂与器材

[0089] 1.待检样本新鲜(4小时内)外周血,EDTA或肝素抗凝。

[0090] 2.荧光标记抗体异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗人CD63抗体,藻红蛋白 (PE) 标记的抗人CD123抗体、多甲藻叶绿素蛋白 (PerCP) 标记的抗人HLA-DR抗体。(三个抗体均来自biolegend公司)

[0091] 3. β -乳球蛋白用于刺激嗜碱粒细胞。同时,包括阳性对照(羊抗人IgE抗体)和阴性对照缓冲液(PBS)。(羊抗人多抗来自abcam)

[0092] 4.一般试剂溶血剂,溶血剂用于溶解红细胞,如BD FACS™Lysing Solution;20mM EDTA;0.5%多聚甲醛(PFA)。

[0093] 5.流式细胞仪、温箱、微量加样器、试管、流式管等。

[0094] 操作方法

[0095] 1.测定管:加入20 μ l含 β -乳球蛋白(10ng/ml,用PBS配制)到1ml EP管的底部;阴性对照管:加入20 μ l PBS,不含过敏原;阳性对照管:加入20 μ l羊抗人IgE抗体(5 μ g/ml)。

[0096] 2.加入100 μ l新鲜全血(EDTA抗凝)到各管中,37℃涡旋的水浴10~15分钟。

[0097] 3.温育后立即转移到冰浴中停止脱颗粒,加入10 μ l 20mM EDTA在室温放置5分钟。

[0098] 4.将各管离心,小心弃上清。

[0099] 5.各管依次加入20 μ l抗CD63-FITC、抗CD123PE和抗HLA-DR PerCP抗体(抗体最终浓度为5 μ g/ml),暗室涡旋冰浴20分钟或者室温15分钟。

[0100] 6.各管加入2ml 1 \times BD FACS™Lysing Solution溶解样品,室温作用15分钟。

[0101] 7.样品300 \times g离心5分钟,弃上清,用1ml含1%BSA磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次。

[0102] 8.离心后弃上清,加入0.3ml 0.5%多聚甲醛(PFA)重悬样品。

[0103] 9.在488nm通过BD FACS™流式细胞分析仪依次分析上述样本。

[0104] 结果判定

[0105] 样本经流式细胞分析仪分析并采集数据后进行如下分析:

[0106] 首先,根据侧向角散射光信号(SSC)、CD123-PE和HLA-DR-PerCP荧光信号设门,选定嗜碱粒细胞群,即侧向角散射光信号低于阈值,且CD123⁺、HLA-DR⁻。如图3所示。

[0107] 其次,根据CD63-FITC荧光信号,确定此标本在β-乳球蛋白刺激情况下,嗜碱粒细胞的激活情况,采用CD123-PE和CD63-FITC双参数作图并计算活化百分比。如图4所示。每例患者均进行阴性对照、阳性对照检测,证明结果可靠性,再根据实验组的结果判定结果,左侧为对牛奶敏感者,右侧为对牛奶不敏感患者,二者阴性对照管均未发生CD63表达,相反,阳性对照管的细胞均发生一定比例的CD63表达,说明实验成立。此时,计数测定管细胞CD63的表达比例,即为待检患者嗜碱性粒细胞被β-乳球蛋白的激活程度。

[0108] 注意事项

[0109] 1. 待检样本必须是新鲜外周血,采血后4小时内完成检测。

[0110] 2. 离心、洗涤应彻底干净,小心弃掉残留液体,避免影响随后加入标记抗体的浓度。

[0111] 3. 荧光受温度影响较大,封固后应低温避光保存待检。

[0112] 4. 荧光染色后的标本应及时观察,不宜久置。一般可于室温放置1小时或4℃放置4小时。

[0113] 临床样本测值(KIU/L)

[0114]

序号	OVA-sIgE	信息表位相关-sIgE	BAT (%)
1	6.1	8.0	23.0
2	8.2	7.0	25.0
3	13.7	9.2	27.0
4	13.3	17.0	45.0
5	28.0	32.0	57.0
6	8.3	5.3	16.0
7	55.0	12.6	46.0
8	41.3	21.5	51.0
9	37.0	23.3	48.0
10	43.2	41.2	64.0
11	24.1	5.1	18.0
12	10.3	5.5	14.0
13	3.5	6.3	24.0
14	9.0	7.0	22.0
15	22.0	32.0	62.0
16	14.0	16.0	33.0
17	11.3	10.0	46.0
18	9.0	6.6	17.0
19	18.3	6.3	18.0
20	9.0	6.7	25.0
21	2.0	2.4	18.0

[0115]

22	70.9	20.5	58.0
23	20.2	21.3	46.0
24	30.1	12.7	62.0
25	7.0	9.1	22.0
26	26.0	23.3	46.0
27	3.0	3.5	11.0
28	20.0	10.2	48.0
29	4.0	4.0	15.0
30	2.0	3.0	16.0
31	12.2	5.0	
32	12.6	19.2	
33	43.0	21.5	
34	2.7	1.8	
35	12.3	6.8	
36	11.0	11.2	
37	3.0	4.0	
38	2.0	2.1	
39	11.4	21.0	
40	10.2	6.9	
41	2.1	2.7	
42	2.7	3.4	
43	4.2	2.3	
44	4.8	7.4	
45	11.0	16.1	
46	2.2	2.2	

[0116]	47	15.4	18.6	
	48	2.0	2.1	

[0117] 结果表明,本发明提供的方法与单组份OVA激活的外周血嗜碱性粒细胞活化实验(BAT)结果具有相关性($R^2=0.722$),两者相关性较好,说明E-sIgE抗体能够反映sIgE在体内的生物活性;相反,与临床实验室使用方法(已知抗原-待检抗体-酶标抗抗体)的结果相关性较差($R^2=0.44$),说明OVA-sIgE抗体为一组不同表位的抗体,抗体亲合力不同,其在体内的病例活性不同,只有亲合力高的sIgE抗体,容易结合相应表位,相继激活肥大细胞。同时,部分标本E-sIgE高于OVA-sIgE,是OVA表位尚未充分暴露所致。而研究结果证实,临床实验室所使用的方法,与临床正常并不完全相关。

[0118] 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。

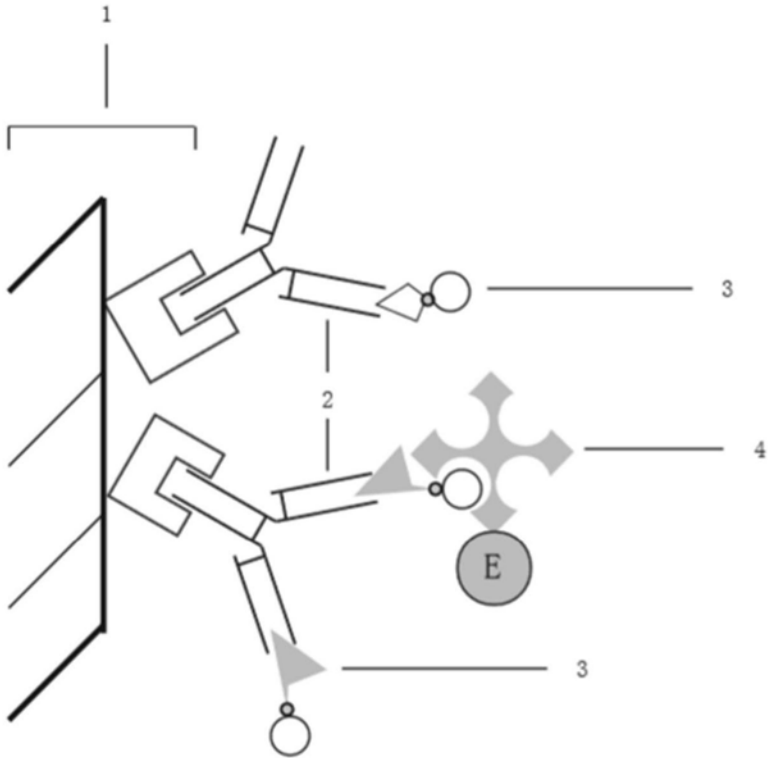


图1

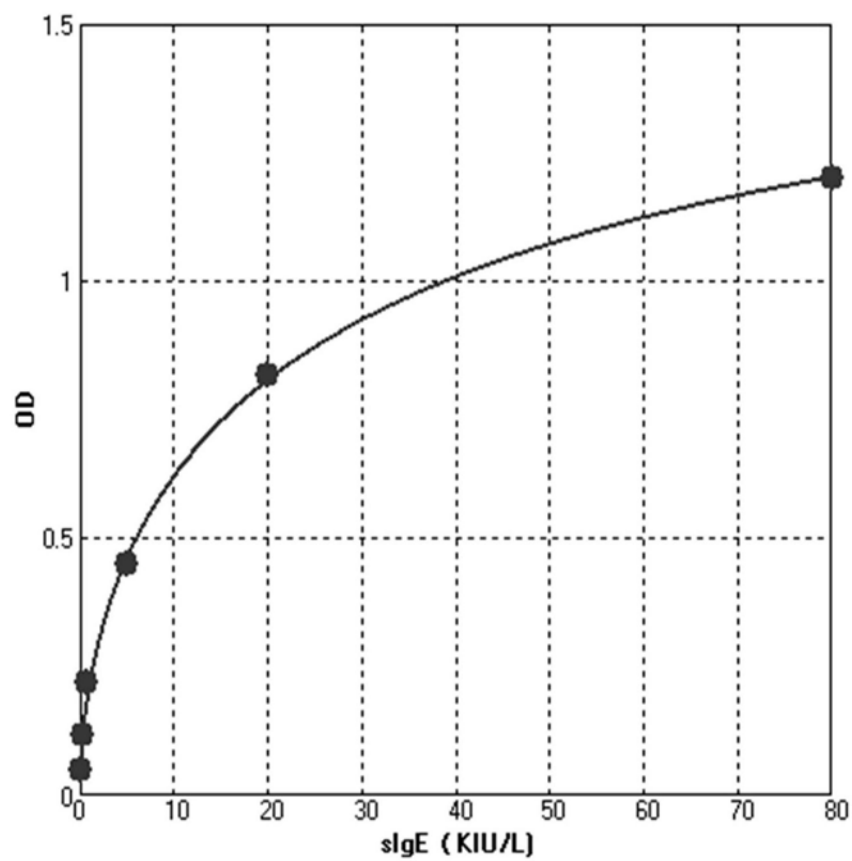


图2

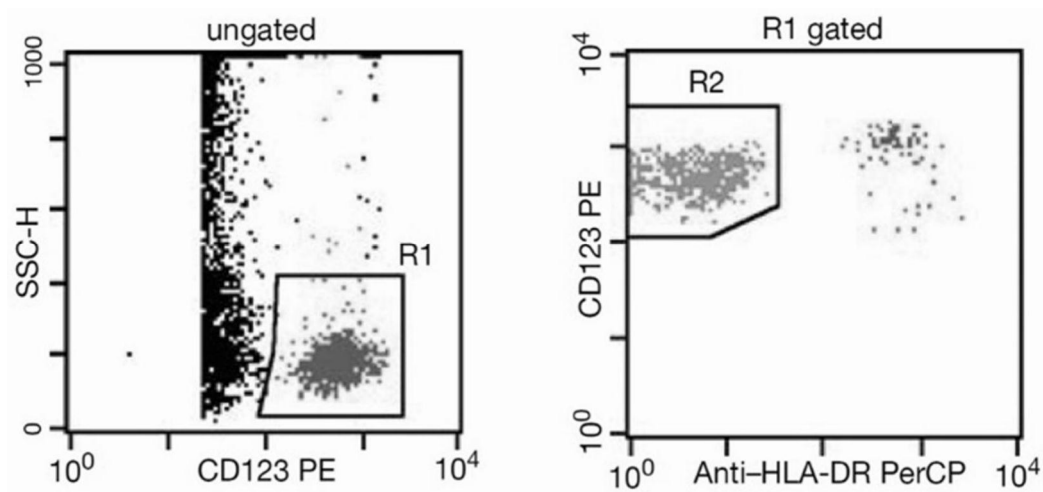


图3

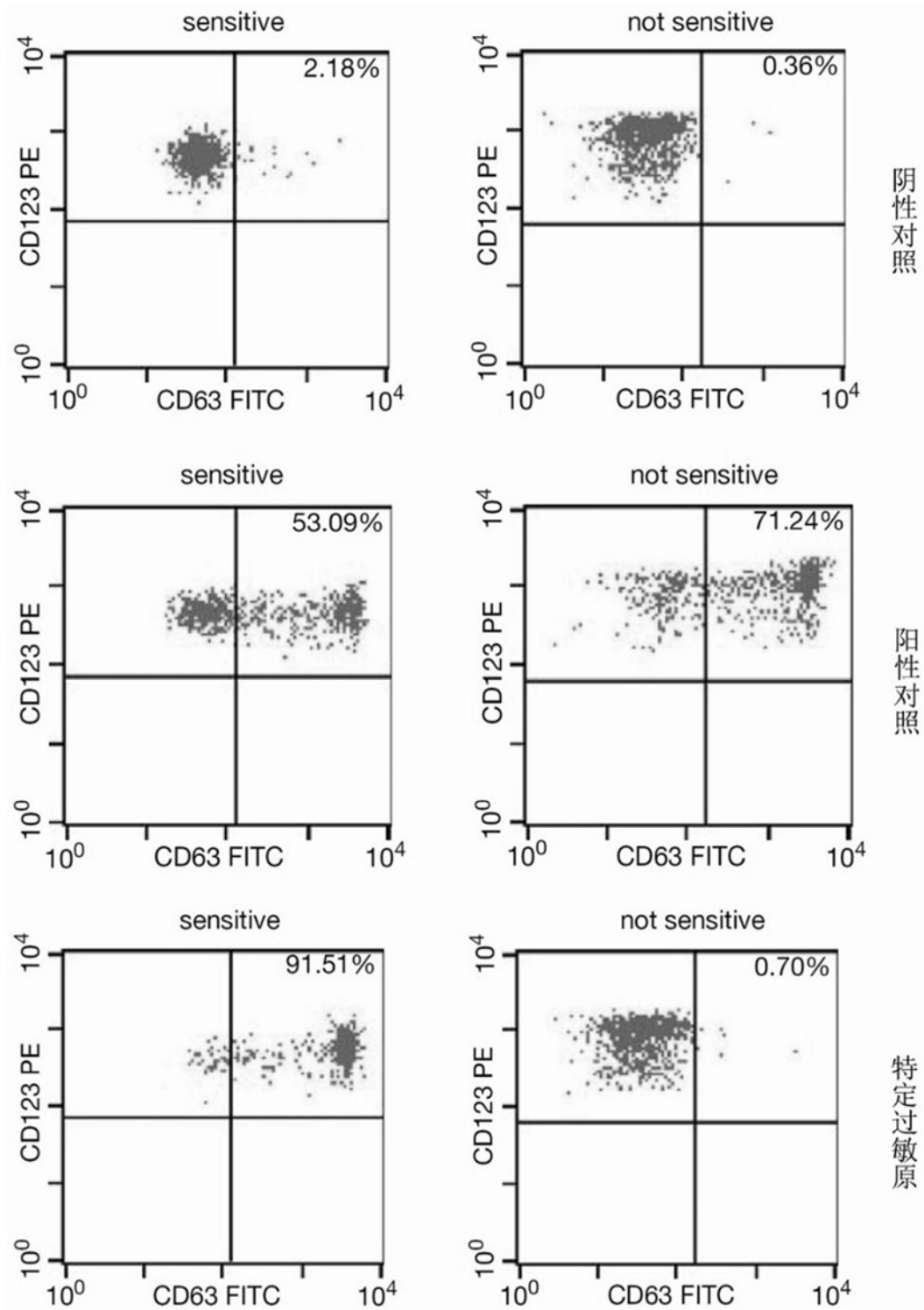


图4

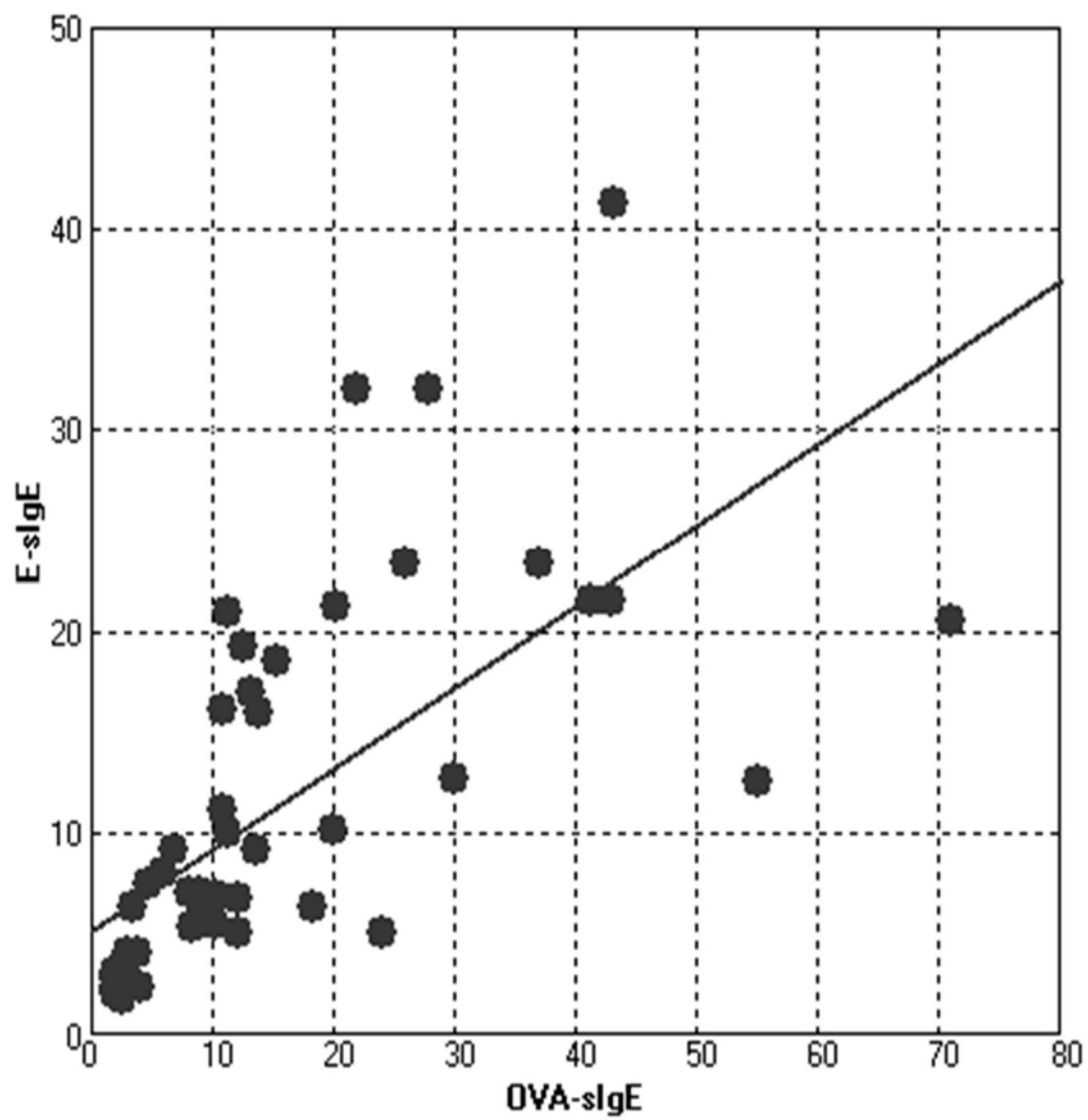


图5

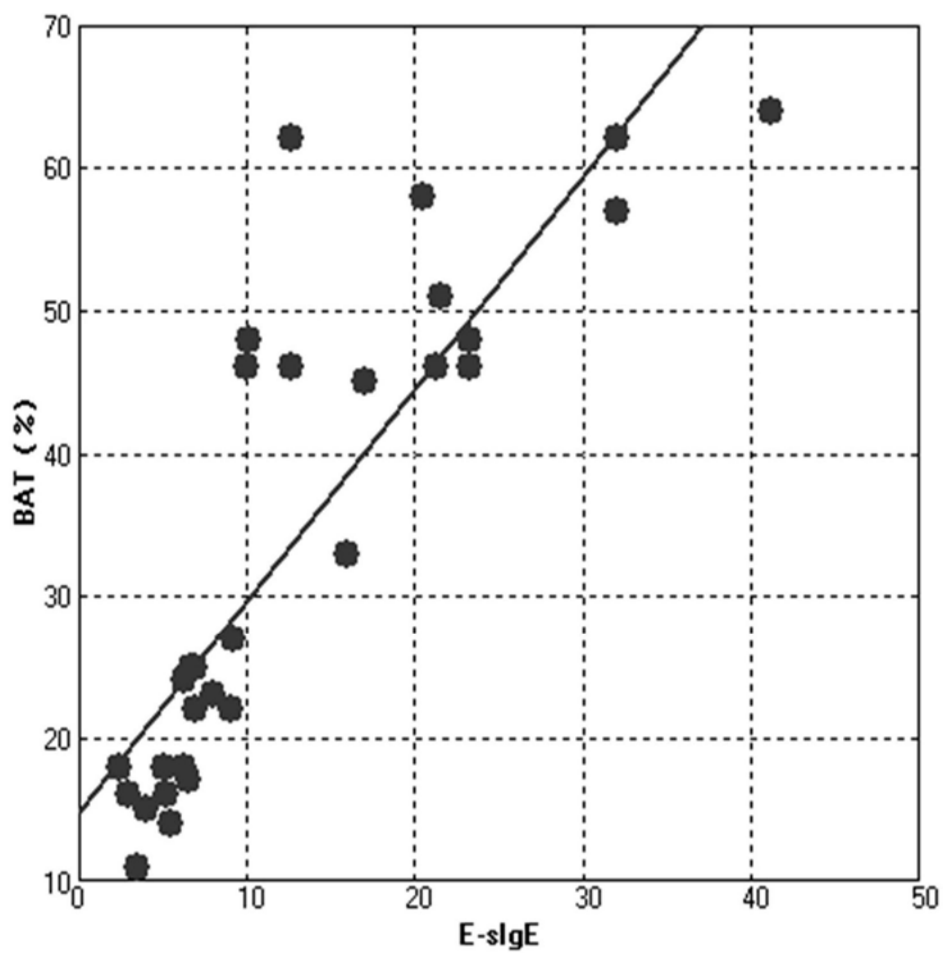


图6

专利名称(译)	过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110716055A	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201910859184.X	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 于洋 张蓓 李军普 崔亚琼 闫娟娟 刘甫		
发明人	李会强 于洋 张蓓 李柳栩 李军普 黄伦辉 崔亚琼 闫娟娟 刘甫		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/6854		
代理人(译)	刘莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种过敏原特异性免疫球蛋白E致病活性检测试剂盒，包括如下试剂，重组人FcεRI-α亚基、生物素标记生物信息表位混合溶液、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素以及生物素标记羊抗人IgE多克隆抗体。本发明采用受体作为捕获分子，直接捕获与受体结合的sIgE分子；采用生物信息表位合成肽段作为已知抗原，是在亚分子(信息表位)水平上进一步精准检测具有致病活性的抗体，提示患者接触相应过敏原后，出现临床症状的危险性。

