



(21)申请号 201710815315.5

(22)申请日 2017.09.15

(71)申请人 深圳市因诺赛生物科技有限公司

地址 518109 广东省深圳市龙华区龙华街道民塘路和平里花园1期B2座2705

(72)发明人 张军方

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

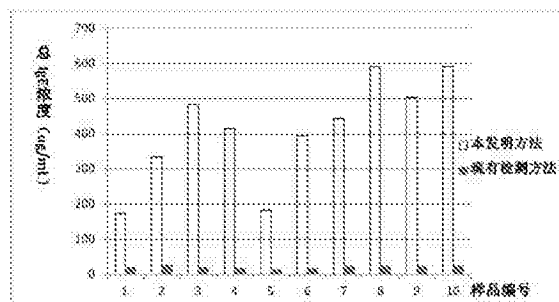
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

人全血中游离型及细胞结合型总IgE测定诊断试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明提供一种人全血中游离型及细胞结合型总IgE测定方法及诊断试剂盒制备。IgE由浆细胞合成分泌后绝大部分通过其受体与细胞(如嗜嗜碱性粒细胞、肥大细胞)结合,只有很少部分游离在血清中。现有IgE检测方法只能检测血清中游离的IgE,不能检测结合于细胞膜上的IgE。本发明通过降低血液pH,将IgE与其位于细胞上的受体解离,进而采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA),实现游离型及细胞结合型总IgE检测。本发明克服了现有IgE检测方法仅检测血清中游离IgE的局限,实现了对游离型及细胞结合型总IgE的检测。



1. 一种人全血中总IgE酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,其特征在于:所述试剂盒可以检测游离型和细胞结合型IgE。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:通过调节全血pH,将IgE与其位于细胞上的受体解离。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,检测的总IgE包括游离型和细胞结合型。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,检测的总IgE是人全血中的IgE。

5. 根据权利要求2所述,pH范围为1-6,推荐pH为4.0。

6. 根据权利要求2所述,所用溶液成分为10mmol/L乳酸,130mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,调节为pH4.0。

人全血中游离型及细胞结合型总IgE测定诊断试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析医学领域,具体是涉及一种全血中游离型及细胞结合型总IgE测定诊断试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] IgE分子是过敏性疾病发展中的关键分子,检测IgE水平在过敏性疾病的诊断及治疗评价中非常重要。近几年来,随着工业化进程的加快发展,人类生活环境和生活方式的急速变化,过敏性疾病发病率不断上升。根据2006年WHO 发表的过敏性疾病流行病学调查结果显示:在接受调查的30个国家和地区12 亿总人口中,有近22% (25000万人) 患有IgE介导的过敏性疾病,如过敏性鼻炎、哮喘、结膜炎、湿疹、食物过敏、药物过敏等。2005年世界卫生组织 (WHO) 的调查显示全球约1.5亿人罹患哮喘;据WAO发布的2011-2012年白皮书报道,这一数字已经增至3亿人,预计到2025年将增长到4亿,2013年 WAO白皮书显示每年约25万人死于哮喘。过敏性疾病对社会的负面影响不仅给患者及其家庭和国家卫生资源带来了巨大的财务负担和压力,还带来了更大的社会成本和人类生活质量问题。因此,过敏性疾病已经被WHO列为二十一世纪重点防治的三大疾病之一,是当前世界性的重大卫生学问题。

[0003] 过敏性疾病是由IgE、肥大细胞和嗜碱性粒细胞、过敏原和细胞因子等多种细胞和因子参与的炎症性疾病。一般认为,IgE分子是导致过敏性疾病的关键分子,IgE有两种类型:一种是在B细胞膜表面经过IgE同种型转向的膜 IgE,另一种则是由浆细胞产生的游离IgE。IgE是 γ 糖蛋白,沉降系数为8S,分子量为190k Da,其耐热性较差,56℃4h即失去结合能力。IgE在正常人血清中含量甚微(50~300ng/mL),一般要用放射免疫分析法才能测出。IgE在血清中的含量波动很大,在过敏性疾病的患者血清中,IgE可上升十倍;在某些寄生虫病、真菌感染和金黄色葡萄球菌感染后其浓度可增加到1000倍于正常值。IgE在血清中的半衰期只有2.5天,很难起到中和过敏原的作用,但由于IgE与嗜碱性粒细胞、肥大细胞和树突状细胞上的高亲和力IgE Fc受体 Fc ϵ RI具有很高的亲和力,IgE的作用被明显放大并可维持数周至数月之久。IgE为亲细胞抗体,其Fc段特与嗜碱粒细胞和肥大细胞表面的高亲和力受体 Fc ϵ RI结合,当二价以上抗原与细胞上IgE结合,使IgE分子桥联,在Ca²⁺存在下,即可触发细胞内生物活性物质释放从而引发变态反应。

[0004] IgE分子最重要的生物学功能是与具有相应受体的靶细胞结合,使靶细胞致敏或发挥免疫调节和保护作用,它在变态反应性疾病的发生发展中起着关键的介导作用。当变应原首次进入机体后,诱导B淋巴细胞的IgM发生类别转换成IgE。特异性B细胞产生IgE抗体应答,IgE阳性B淋巴细胞分泌游离IgE 到血液中,游离IgE与肥大细胞或者嗜碱性粒细胞表面的IgE高亲和力受体 Fc ϵ RI结合,此时机体处于致敏状态。机体再次接触变应原后,过敏原与肥大细胞表面的过敏原特异性IgE进行结合,导致肥大细胞的脱颗粒,释放及合成大量过敏介质(如组胺、白三烯和血小板激活因子等),从而引起局部或者全身过敏反应。

[0005] 除与肥大细胞和嗜碱性粒细胞的Fc ϵ RI结合外,IgE还可与B细胞和单核细胞表达

的FcεRⅡ结合,这有利于B细胞对变应原的摄入、处理并提呈给T淋巴细胞,进而增强机体对变应原的免疫应答。IgE是FcεRI与FcεRⅡ的正向调节剂,抗IgE治疗可减少嗜碱性粒细胞等效应细胞上的IgE受体数量。另外,在CD79的协同作用下,膜IgE还能激发B细胞增殖和分化。

[0006] IgE在过敏性疾病中起着重要作用,并且还是临床治疗过敏性疾病的重要靶点。中和血液中IgE的方法主要是特异性地结合并中和血清中游离的IgE,阻止IgE分子与靶细胞上IgE受体结合,从而抑制过敏原诱导的早/晚期超敏反应。

[0007] 目前检测IgE仅能检测血清中游离IgE,不能检测结合在细胞上的IgE。一般采用双抗体夹心法检测血清中游离IgE,具体方法有放射免疫法、酶免疫分析和化学发光免疫分析,由于操作简便、所需设备简单,以酶免疫分析比较普及。其测定原理为:将针对IgE的两种抗体,一种包被于微孔板,另一种标记辣根过氧化物酶(或者碱性磷酸酶)。先加入待测血清,血清中的IgE与固相表面的IgE抗体结合,然后洗涤未结合的物质,再加入酶标记的第二种IgE抗体,形成双抗夹心复合物,最后加入酶的底物,通过颜色变化来检测样品中的IgE浓度。

[0008] IgE在正常人血清中含量甚微(50~300ng/mL),一般要用放射免疫分析法才能测出,而且由于数值较低,检测结果可信度不高。另一方面,IgE在血清中不稳定,的半衰期只有2.5天,血清中的IgE波动幅度较大。绝大部分IgE通过其受体结合与细胞表面,如嗜嗜碱性粒细胞、肥大细胞和树突状细胞,过敏反应的过程依赖于位于细胞上的IgE对靶细胞的活化,产生并脱颗粒释放出大量生物活性介质,这些活性介质会导致白细胞募集,腺体分泌增加,组织肿胀,支气管收缩,血管通透性增加,粘膜炎症等过敏症状。因此,检测位于细胞上的IgE对于过敏反应的诊断至关重要。

发明内容

[0009] 本发明要解决的问题是提供一种全血总IgE(游离型和细胞结合型)的检测诊断试剂盒及制备和使用方法,以解决现有IgE检测试剂盒只能检测血清中游离型IgE的局限。由于细胞结合型IgE含量是游离型IgE含量的10-100倍,因此本发明克服了现有检测试剂盒检测灵敏度低的问题。本发明采用免疫分析,具有较高的灵敏度和精密度,同时操作简便,适用于临床样品的大规模检测。

[0010] 本发明的检测原理:IgE由浆细胞合成分泌后绝大部分通过其受体(FcεR1,FcεR2)与细胞(如嗜嗜碱性粒细胞、肥大细胞)结合,只有很少部分游离在血清中。通过降低溶液的pH至酸性,可以将结合在细胞膜上的IgE与其受体解离,释放到溶液中,再通过离心除去细胞,将离心后的上清吸出后调pH至中性,再通过双抗夹心法检测总IgE的水平。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案是一种全血中游离型及细胞结合型总IgE测定诊断试剂盒及制备方法。所述试剂盒包括:

[0012] 包被有IgE抗体的96孔酶标板。每孔包被将抗人IgE抗体100ng。

[0013] 标准品。标准品浓度依次为:480、240、120、60、30、15μg/mL。

[0014] 样品稀释液。1L样品稀释液中含:磷酸二氢钾(KH₂PO₄):0.27g,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄):1.42g,氯化钠(NaCl):8g,氯化钾(KCl)0.2g,4g BSA, pH7.4。

[0015] 检测抗体-HRP。HRP标记的抗人IgE抗体。

- [0016] 20×洗涤缓冲液。1L 20×洗涤缓冲液包含:KH₂PO₄ 4克, Na₂HPO₄·12H₂O 58克, NaCl 160克, KCl 4克, Tween-20 10mL。
- [0017] 显色底物A。
- [0018] 显色底物B。
- [0019] 终止液。
- [0020] 封板膜。
- [0021] 使用说明书。
- [0022] 本发明还提供了一种用上述试剂盒检测全血总IgE的方法,包括以下步骤:
- [0023] 从室温平衡20min后的铝箔袋中取出所需板条,剩余板条用自封袋密封放回4℃。
- [0024] 设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品50μL;
- [0025] 样本孔中加入待测样本50μL;空白孔不加。
- [0026] 除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体100μL,用封板膜封住反应孔,37℃水浴锅或恒温箱温育60min。
- [0027] 弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液 (350μL),静置1min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次 (也可用洗板机洗板)。
- [0028] 每孔加入底物A、B各50μL,37℃避光孵育15min。
- [0029] 每孔加入终止液50μL,15min内,在450nm波长处测定各孔的OD值。
- [0030] 本发明具有的优点和积极效果是:
- [0031] 本发明可以同时检测游离型及细胞结合型总IgE,克服了现有检测方法仅能检测游离型IgE的局限;
- [0032] 细胞结合型IgE含量是游离型IgE含量的10-100倍,因此该方法检测到的总IgE含量较现有试剂盒更准确可信,避免了样品中IgE含量过低导致的数据不准确问题;
- [0033] 本发明的试剂盒检测方便,能够快速的测定全血中总IgE浓度,从而辅助临床进行诊断治疗,临床推广好。

附图说明

- [0034] 图1是本发明的IgE浓度标准曲线
- [0035] 图2是本发明检测总IgE浓度与现有检测方法对比

具体实施方式

- [0036] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。
- [0037] 实施例1
- [0038] 一种全血中游离型及细胞结合型总IgE测定诊断试剂盒,包括:
- [0039] 包被有IgE抗体的96孔酶标板。
- [0040] 标准品。标准品浓度依次为:480、240、120、60、30、15μg/mL。
- [0041] 样品稀释液。
- [0042] 检测抗体-HRP。
- [0043] 20×洗涤缓冲液。
- [0044] 显色底物A。

- [0045] 显色底物B。
- [0046] 终止液。
- [0047] 封板膜。
- [0048] 使用说明书。
- [0049] 通过如下步骤配置上述的试剂盒：
- [0050] 包被有IgE抗体的96孔酶标板。每孔包被将抗人IgE抗体100ng。
- [0051] 标准品。标准品浓度依次为：480、240、120、60、30、15 μ g/mL。
- [0052] 样品稀释液。1L样品稀释液中含：磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)：0.27g，磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)：1.42g，氯化钠 (NaCl)：8g，氯化钾 (KCl) 0.2g，4g BSA，pH7.4。
- [0053] 检测抗体-HRP。HRP标记的抗人IgE抗体。
- [0054] 20 $\times$ 洗涤缓冲液。1L 20 $\times$ 洗涤缓冲液包含：KH₂PO₄ 4克，Na₂HPO₄·12H₂O 58克，NaCl 160克，KCl 4克，Tween-20 10mL。
- [0055] 实施例2
- [0056] 一种实施例1制备的试剂盒的使用方法，包括如下步骤：
- [0057] 从室温平衡20min后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4 $^{\circ}$ C。
- [0058] 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50 μ L；
- [0059] 样本孔中加入待测样本50 μ L；空白孔不加。
- [0060] 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体100 μ L，用封板膜封住反应孔，37 $^{\circ}$ C水浴锅或恒温箱温育60min。
- [0061] 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液 (350 μ L)，静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次 (也可用洗板机洗板)。
- [0062] 每孔加入底物A、B各50 μ L，37 $^{\circ}$ C避光孵育15min。
- [0063] 每孔加入终止液50 μ L，15min内，在450nm波长处测定各孔的OD值。
- [0064] 实施例3
- [0065] 本发明所制备的试剂盒的性能检测。
- [0066] 精密度测试试验
- [0067] 测试方法：用正常人全血分为高、中、低值待测样本，在同一次实验中测定总IgE含量，每个样本平行做10次，计算批内变异系数 (CV)；在不同实验日测定IgE含量，每个样品平行做10次，计算批间变异系数。
- [0068] 表1 本发明的精密度测定结果

[0069]

组 别	批内			批间		
	平均值	SD	CV	平均值	SD	CV
	(μ g/mL)	(μ g/mL)	(%)	(μ g/mL)	(μ g/mL)	(%)
高值	1206	46	3.8	1206	63	5.2
中值	835	22	2.6	834	33	4.0
低值	431	12	2.8	432	19	4.4

[0070] 以上对本发明的较佳实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依照本发明申请所做出的改进等,均属于本发明的专利涵盖范围之内。

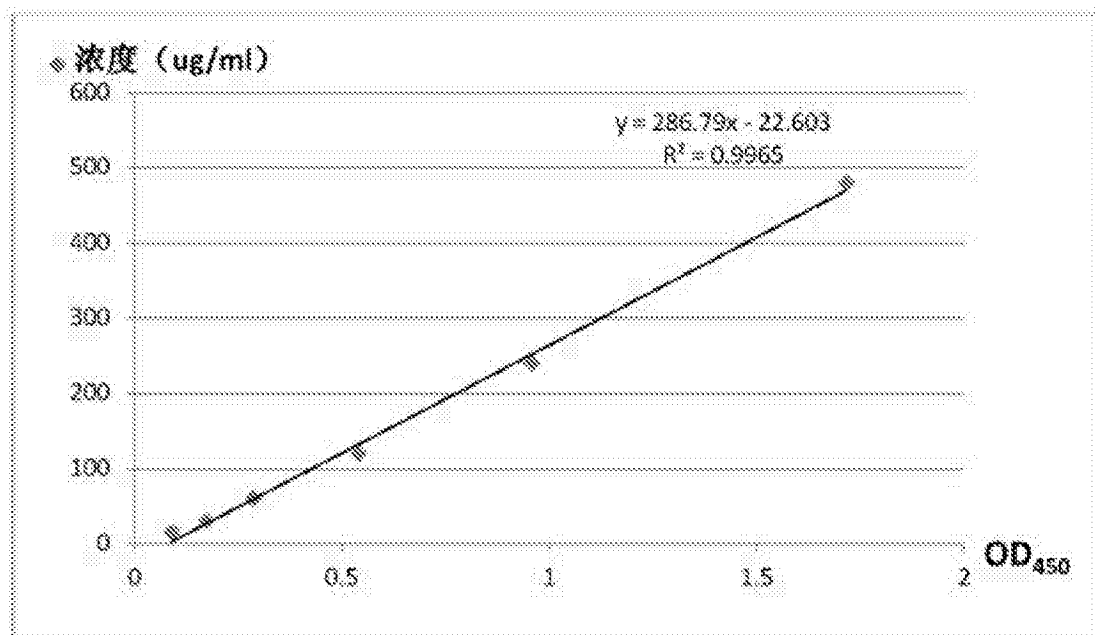


图1

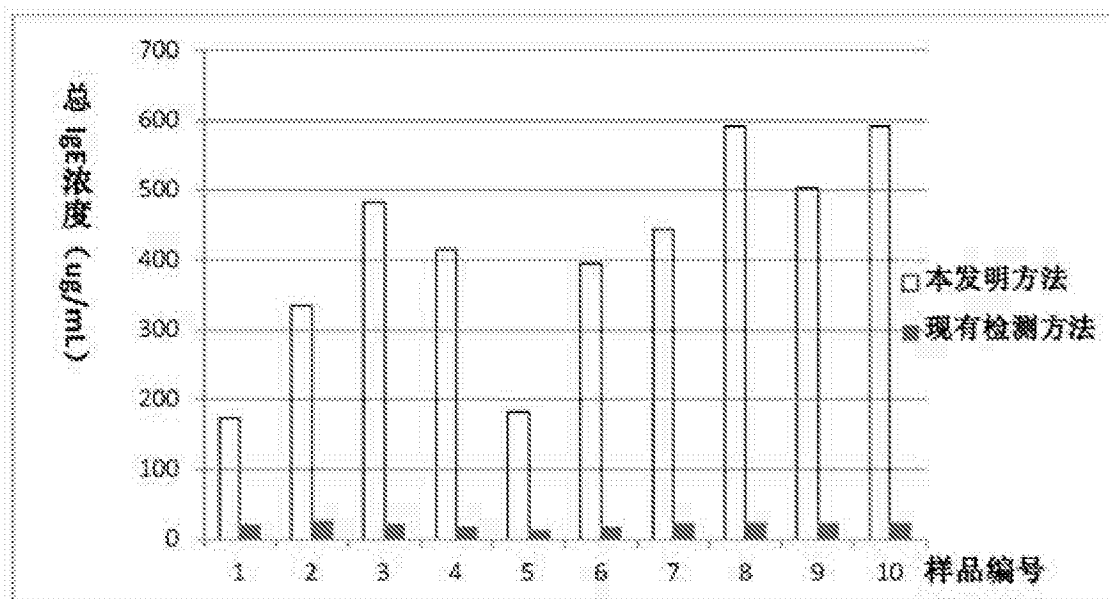


图2

专利名称(译)	人全血中游离型及细胞结合型总IgE测定诊断试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN107621548A	公开(公告)日	2018-01-23
申请号	CN2017110815315.5	申请日	2017-09-15
[标]发明人	张军方		
发明人	张军方		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种人全血中游离型及细胞结合型总IgE测定方法及诊断试剂盒制备。IgE由浆细胞合成分泌后绝大部分通过其受体与细胞(如嗜嗜碱性粒细胞、肥大细胞)结合，只有很少部分游离在血清中。现有IgE检测方法只能检测血清中游离的IgE,不能检测结合于细胞膜上的IgE。本发明通过降低血液pH,将IgE与其位于细胞上的受体解离,进而采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)，实现游离型及细胞结合型总IgE检测。本发明克服了现有IgE检测方法仅检测血清中游离IgE的局限，实现了对游离型及细胞结合型总IgE的检测。

