



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103823069 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410083337. 3

(22) 申请日 2014. 03. 07

(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 侯丽英 朱黎娜 林书祥

常艳敏 李迺昶

(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 杨慧玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

血清特异性 IgE 生物学活性检测方法及其所使用的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种血清特异性 IgE 生物学活性检测方法及其所使用的试剂盒,该方法以 KU812 细胞系为指示细胞,诱导表达 IgE-Fc 受体;将受试者血清与 KU812 细胞温育,促使血清中的待检 sIgE 与 KU812 细胞表面 IgE-Fc 受体结合;此时,加入特定过敏原,过敏原与 KU812 细胞表面 sIgE 结合,导致受体交联并激活 KU812 细胞,细胞脱颗粒并释放组织胺,同时促进细胞内的 CD63 分子转移到细胞膜表面。此时,用荧光素标记 - 抗 CD63 抗体进行细胞免疫染色,采用流式细胞仪测定表达 CD63 细胞的百分比,最终确定 KU812 细胞激活强度。本发明的有益效果是该方法可以评估患者接触过敏原发生过敏的风险程度,同时也可用于评估特异性脱敏治疗的临床效果。

1. 血清特异性 IgE 生物学活性检测方法,其特征在於:包括如下步骤:

(1)将 KU812 细胞系即人外周血嗜碱性白血病细胞中加入待测血清,使 KU812 细胞表面的 IgE-Fc 段受体与待测血清中 sIgE 抗体的 Fc 段结合,以此令 KU812 细胞处于致敏状态;

(2) 将步骤(1)中处于致敏状态的 KU812 细胞等分为三组,分别为阳性对照组、阴性对照组和实验组,阳性对照组中加入抗人 IgE 抗体,阴性对照组加入缓冲液,实验组中加入已知过敏原,以此对各组中的 KU812 细胞进行激发;

(3) 分别检测并计算阳性对照组、阴性对照组和实验组中 KU812 细胞的细胞激活百分比,通过对比各组中 KU812 细胞的细胞激活百分比来确定待检测血清中特异性 IgE 致病活性。

2. 根据权利要求 1 所述的血清特异性 IgE 生物学活性检测方法,其特征在於:所述的已知过敏原包括牛奶、鸡蛋、虾、蟹、小麦、坚果。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的血清特异性 IgE 生物学活性检测方法,其特征在於:步骤(2)中细胞的激发条件为将加入已知过敏原的各组细胞放入细胞培养箱 30min,30min 后立即转移到冰浴停止激发反应,加入 EDTA 溶液,室温放置 5min。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的血清特异性 IgE 生物学活性检测方法,其特征在於:步骤(3)中检测计算 KU812 细胞的细胞激活百分比的步骤为:①给阳性对照组、阴性对照组和实验组分别加入 FITC 标记-抗 CD63 抗体,使各组中的 KU812 细胞与 FITC 标记-抗 CD63 抗体结合;②洗去未结合的 FITC 标记-抗 CD63 抗体,用流式细胞仪检测各组中结合的 CD63 阳性细胞的数量;③计算 CD63 阳性细胞百分比即为细胞激活百分比,该阳性细胞百分比的计算方法为:各组中 CD63 阳性细胞的数量除以各组总的 KU812 细胞数量。

5. 应用如权利要求 1 至 4 中任一项所述的血清特异性 IgE 生物学活性检测方法所使用的试剂盒,其特征在於:包括

(1) KU812 细胞系;

(2)抗人 IgE 抗体;

(3)抗-CD63-FITC 标记抗体;

(4)系列过敏原溶液。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在於:还包括细胞培养基、Hanks 溶液、磷酸盐缓冲盐水、细胞培养板。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在於:所述细胞培养板为 6 孔、12 孔或 24 孔。

8. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在於:所述细胞培养基为含 15% 以上胎牛血清-RPMI-1640 培养基。

9. 根据权利要求 5 至 8 中任一项所述的试剂盒,其特征在於:所述已知过敏原包括牛奶、鸡蛋、虾、蟹、小麦、坚果。

血清特异性 IgE 生物学活性检测方法及其所使用的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种血清特异性 IgE 生物学活性检测方法及其所使用的试剂盒,用于评估过敏患者血清特异性 IgE 致病活性。

背景技术

[0002] 变态反应是机体受到某些抗原刺激时发生的异常免疫应答,可表现为生理功能紊乱或(和)组织细胞损伤。根据发生机制和临床特点不同,变态反应分为 4 种类型,其中 I 型变态反应又称为过敏反应,主要由免疫球蛋白 E (IgE)介导、肥大细胞或嗜碱性粒细胞参与。过敏反应主要特点表现为:①发生快,消退亦快;②由 IgE 介导、肥大细胞或嗜碱性粒细胞参与;③通常引起机体生理功能紊乱,一般不遗留组织损伤;④具有明显个体差异和遗传背景。临床严重的过敏反应表现为过敏性休克,吸入过敏原可导致顽固性过敏性哮喘和过敏性鼻炎,食入过敏原可导致过敏性肠胃炎等症状。正常人血清中 IgE 含量极低,而过敏反应患者血清中 IgE 含量较高,特别是出现特异性 IgE 含量异常增高,故临床常通过检测血清总 IgE 水平判断受检者是否属于过敏体质,通过检测血清含有哪一种特异性 IgE (sIgE)判断受检者对何种物质过敏。分布在组织中的肥大细胞和外周血中的嗜碱性粒细胞胞浆富含嗜碱性颗粒,内含多种生物活性介质;同时,嗜碱性粒细胞和肥大细胞表面表达高亲和性 IgE Fc 段受体(Fc ϵ R I),此受体与 IgE 的 Fc 段结合,使细胞处于致敏状态。当过敏原再次进入机体,与肥大细胞及嗜碱性粒细胞表面 IgE 结合,使 Fc ϵ R I 交联,导致细胞脱颗粒,释放组胺、激肽原酶(可催化激肽、缓激肽形成)等,与即刻或早期相反应有关;细胞合成和释放白三烯、前列腺素 D₂、血小板活化因子、细胞因子等,与迟发相反应有关。

[0003] 确定过敏原是临床过敏性疾病诊断和特异性脱敏治疗的重要环节。目前,确定过敏原的方法包括体内试验和体外试验。体内试验如皮内试验,测定时,将充分稀释的无菌过敏原提取液注入皮内产生 1 或 2mm 皮丘,每次皮肤试验应包括单独稀释液的阴性对照和组胺(挑刺试验为 10mg/ml 或皮内试验为 0.1mg/ml)的阳性对照。若在 15 分钟内产生风团和红斑,且风团直径比对照至少大 0.5cm 以上则为阳性。体外试验主要是血清 sIgE 检测,通过患者血清中有何种特异性抗体间接推测诱导抗体产生的过敏原。sIgE 检测的常用方法是放射免疫分析和酶标免疫分析。比较经典的方法是放射变应原吸附剂试验,检测原理是将纯化的变应原与固相载体结合,加入待检血清及参考对照,再与同位素标记的抗人 IgE 抗体反应,然后测定固相载体的放射活性,通过标准曲线求出待检血清中 sIgE 的含量,或在标本放射活性高于正常人均数加 3 倍标准差(3S)时判为阳性。酶免疫分析的原理及步骤基本同放射免疫技术,仅是最后加入酶标记的抗人 IgE,利用酶底物进行显色判定实验结果。如今临床广泛采用酶免疫印迹法,此方法是以硝酸纤维素(NC)膜为固相载体,以线性方式于不同位置包被系列的不同过敏原,与血清温育后,再通过酶标抗人 IgE 进行检测。

[0004] 综合上述实验原理可知,皮内试验是检测肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面是否存在 sIgE,同时也可反映此种 sIgE 能否结合相应过敏原。因此,皮内试验属于一种生物活性试验,能够反映血清 sIgE 的生物活性(也可理解为此抗体的致病活性)。皮内试验具有很高的

诊断特异性,但同时有一定风险性(超敏患者即使接触微量过敏原也会导致临床症状,如休克等);同时检测多种过敏原(筛查)时给受试者造成痛苦,实施难度较大;如受试者经过药物治疗后往往会影响检测结果。血清 sIgE 能够克服皮内试验的众多不足,具有安全、简单,多种过敏原同时测定等优点,已被临床实验室广泛应用。但是,需要指出:与皮内试验不同,血清 sIgE 检测是以一组疑似过敏原作为已知抗原,与待检血清温育后,观察血清中存在哪一种或几种 sIgE。因此,从检测原理讲血清 sIgE 只能反映待检 sIgE 结合抗原的特性,不能够反映此种抗体是否能够结合肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的 $Fc\epsilon R$;如果此抗体不能结合 $Fc\epsilon R$,不会导致机体致敏,也就不能发生过敏反应。总而言之,现在临床使用的血清 sIgE 检测方法,不能实现对血清 sIgE 的免疫活性进行检测,是存在一定缺陷的。

[0005] 此外,嗜碱性粒细胞是过敏反应重要的效应细胞之一。嗜碱性粒细胞具有 IgE-Fc 受体,该受体可结合 IgE 分子,使细胞处于致敏状态。当致敏的嗜碱性粒细胞受到特定过敏原刺激后,过敏原与细胞表面特定抗原结合,通过受体交联致使嗜碱性粒细胞活化并脱颗粒释放组胺等生物活性介质。CD63 是嗜碱性粒细胞组胺颗粒囊泡膜表面的重要标志,当嗜碱性粒细胞活化并释放出颗粒时,囊泡膜融入细胞膜,CD63 分子转移到细胞膜表面,为经流式细胞术检测活化脱颗粒嗜碱性粒细胞提供了分子基础。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种血清特异性 IgE 生物学活性检测方法,以及所使用的检测试剂盒;具体讲本技术发明以 KU812 细胞系(人外周血嗜碱性白血病细胞)为指示细胞,诱导表达 IgE-Fc 受体,此受体具有与血清 IgE 结合的特性。将受试者血清与 KU812 细胞悬液共同温育培养,血清中的 sIgE 与 KU812 细胞表面 IgE-Fc 受体结合;此时,加入特定过敏原,过敏原与 KU812 细胞表面 sIgE 结合,导致受体交联并激活 KU812 细胞,细胞脱颗粒并释放组织胺,同时促进细胞内的 CD63 分子转移到细胞膜表面。此时,用荧光素标记-抗 CD63 抗体进行细胞免疫组化染色,采用流式细胞仪测定表达 CD63 细胞的百分比,最终确定 KU812 细胞激活强度(KU812 细胞激活强度(CD63 阳性细胞百分比)与待检血清中 sIgE 制备活性表现为正相关。

[0007] 该检测方法包括如下步骤:

[0008] (1) 将 KU812 细胞即人外周血嗜碱性白血病细胞中加入待测血清,使 KU812 细胞表面的 IgE-Fc 段受体与待测血清中 sIgE 抗体的 Fc 段结合,以此令 KU812 细胞处于致敏状态;

[0009] (2) 将步骤(1)中处于致敏状态的 KU812 细胞等分为三组,分别为阳性对照组、阴性对照组和实验组,阳性对照组中加入抗人 IgE 抗体,阴性对照组加入缓冲液,实验组中加入已知过敏原,以此对各组中的细胞进行激发;

[0010] (3) 分别检测并计算阳性对照组、阴性对照组和实验组中 KU812 细胞的细胞激活百分比,通过对比各组中 KU812 细胞的细胞激活百分比来确定待检测血清中特异性 IgE 致病活性。

[0011] 其中,步骤(2)中所述的激发条件为放入细胞培养箱 30min,30min 后立即转移到冰浴停止激发反应,加入 EDTA 溶液,室温放置 5min。

[0012] 步骤(3)中检测计算 KU812 细胞的细胞激活百分比的步骤为:①收集阳性对照组、

阴性对照组和实验组的细胞经离心洗涤后分别加入 FITC 标记 - 抗 CD63 抗体,使各组中的 KU812 细胞(激活的细胞均表达 CD63)与 FITC 标记 - 抗 CD63 抗体结合;②洗去未结合的 FITC 标记 - 抗 CD63 抗体,用流式细胞仪检测各组中结合的 CD63 阳性细胞的数量并计算阳性细胞的百分比(CD63 阳性细胞数 / 所计数细胞数),各组中 CD63 阳性细胞的数量除以各组总的 KU812 细胞数量即为各组最终的细胞激活百分比。

[0013] 本发明还提供一种用于待检血清特异性 IgE 生物学活性检测方法所使用的试剂盒,该试剂盒包括:① KU812 细胞系;②抗人 IgE 抗体;③抗 -CD63-FITC 标记抗体;④系列过敏原溶液。

[0014] 进一步,实施本检测过程,实验室还应具备细胞培养基、Hanks 溶液、磷酸盐缓冲盐水和细胞培养板等细胞生物学实验室常用器材。

[0015] 其中,所述培养板可以为 6 孔、12 孔或 24 孔,以 24 孔板最优。

[0016] 该试剂盒中:① KU812 细胞系即人外周血嗜碱性白血病细胞购自美国模式菌种收集中心(ATCC);②抗人 IgE 抗体:采用单克隆抗体和多克隆抗体均可,可购自英国 ABCAM 公司;③抗 -CD63-FITC 标记抗体:可购自美国 BD 公司;④系列过敏原溶液:用于点刺试验过敏原稀释至最佳工作溶度即可,特殊过敏原也可自制。

[0017] KU812 细胞为悬浮细胞,培养传代简单,无特殊要求,采用含 15% 以上胎牛血清 -RPMI-1640 培养基即可。

[0018] 细胞培养基、Hanks 溶液、磷酸盐缓冲盐水、细胞培养板均为常用试剂。

[0019] 以上所提到的已知过敏原包括:牛奶、鸡蛋、虾、蟹、小麦、坚果等。

[0020] 本发明具有的优点和积极效果是:本发明中血清特异性 IgE 生物学活性检测方法能够检测血清 sIgE 与嗜碱性粒细胞结合的活性,以及与过敏原结合后造成嗜碱性粒细胞脱颗粒的活性。通过血清特异性 IgE 生物活性测定能够评估患者血清中特异性 IgE 的致病活性,进而评估患者接触此种过敏原发生过敏的风险程度,同时也可用于评估特异性脱敏治疗的临床效果。

具体实施方式

[0021] 一种应用该血清特异性 IgE 生物学活性检测方法所使用的试剂盒,该试剂盒包括:① KU812 细胞系,购自美国模式菌种收集中心(ATCC);②抗人 IgE 抗体,购自英国 ABCAM 公司;③抗 -CD63-FITC 标记抗体,购自美国 BD 公司;④系列过敏原溶液。

[0022] 完成本技术发明所说的检测项目,还需要包括细胞培养基、Hanks 溶液、磷酸盐缓冲盐水、细胞培养板等细胞实验室常规溶液,并配合使用流式细胞仪、水平离心机等仪器。

[0023] 其中 KU812 细胞为悬浮细胞,采用含 15% 以上胎牛血清 -RPMI-1640 培养基即可。培养板可以为 6 孔、12 孔或 24 孔。

[0024] 现以检测牛奶特异性 IgE 生物活性为例,检测过程如下:

[0025] (1)准备指示细胞:取对数生长期 KU812 细胞,用 Hanks 溶液洗涤细胞并调整细胞浓度至 1×10^6 个 / 毫升,置细胞培养箱中备用。

[0026] (2)将待检血清(含 sIgE,如牛奶特异性 IgE 抗体)用细胞培养基稀释 10 倍后,经 0.22 微米滤膜过滤除菌备用。

[0027] (3)致敏:取 24 孔细胞培养板,设定实验组、阳性对照组、阴性对照组,每孔分别加

入细胞悬液 1 毫升,再加入稀释后待检血清 0.2 毫升,置细胞培养箱中温浴 2 小时,确保 sIgE 与 KU812 细胞表面的 IgE-Fc 受体结合。

[0028] (4)激发:阴性对照组加入 0.2 毫升磷酸缓冲盐水溶液(PBS),阳性对照组加入 0.2 毫升用 PBS 稀释的抗人-IgE 多克隆抗体(10 微克/毫升),实验组加入 0.2 毫升牛奶过敏原(0.1 微克/毫升)。阴性对照组、阳性对照组、实验组过敏原激发条件为细胞培养箱 30 分钟。30 分钟后立即转移到冰浴停止脱颗粒,加入 10 微升 20-毫摩尔 EDTA 溶液在室温放置 5 分钟。

[0029] (5)抗体染色:混悬各孔细胞并取 0.5 毫升至 1.5 毫升离心管内,离心 1500RPM50 分钟,弃上清液并混悬细胞;各管分别加入 20 微升 FITC 标记-抗 CD63 抗体,置暗室涡旋室温反应 20 分钟。待反应结束后用 1-2 毫升 PBS 洗涤 2 次;最后加入 0.3 毫升 0.5% 多聚甲醛(PFA)重悬细胞。

[0030] (6)流式细胞仪检测 KU812 细胞中 CD63 阳性细胞的百分比:采用 488nm 作为激发波长,每次检测前均用 FlowCheck 荧光微球(Beckman Coulter)校准仪器,测定 CD63 阳性细胞数量并计算阳性细胞百分比,阳性细胞百分比为 CD63 阳性细胞数量除以总细胞数量。

[0031] 说明:步骤(3)中实验组数目的确定根据待测过敏原的数量而定,如待检血清只含有牛奶抗体,检测待检血清牛奶抗体(IgE)的生物活性,实验组设置 1 孔即可;如待检血清含有牛奶抗体和蛋清抗体,需同时检测血清牛奶抗体(IgE)和蛋清抗体(IgE)的生物活性,实验组设置 2 孔,分别标记为牛奶和蛋清。

[0032] 检测结果评估:首先,检查阴性对照组和阳性对照组的結果是否正常,一般情况下,阴性对照组应小于 10%,阳性对照组应大于 80%,可视为检测程序正常。其次,根据实验组 CD63 阳性细胞百分比判断血清中特异性 IgE 的致病活性,进而推知该患者对于接触此过敏原时是否存在风险,也可动态观察脱敏治疗前后组 CD63 阳性细胞百分比变化评估脱敏治疗是否有效。

[0033] 患者接触某过敏原时评估标准如下:

[0034] 无风险:0 ~ 20%

[0035] 弱风险:21 ~ 40%

[0036] 低风险:41 ~ 60%

[0037] 中风险:61 ~ 80%

[0038] 高风险:81 ~ 100%

[0039] 检测结果举例:待检样品为牛奶过敏患者血清,采用牛奶过敏原激活。

[0040] CD63 阳性细胞百分比计算结果为:

[0041] 阴性对照组:5.5%;

[0042] 阳性对照组:88.4%;

[0043] 实验组:72.8%;

[0044] 结论分析:待检血清中牛奶特异性 IgE 能够促使 72.8% 的嗜碱性粒细胞活化并表达 CD63 分子;此结果说明患者血清牛奶特异性 IgE 具有致病活性,如患者接触牛奶后发生过敏症状存在中度风险。

[0045] 以上对本发明的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。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等,

均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。

专利名称(译)	血清特异性IgE生物学活性检测方法及其所使用的试剂盒		
公开(公告)号	CN103823069A	公开(公告)日	2014-05-28
申请号	CN201410083337.3	申请日	2014-03-07
[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 侯丽英 朱黎娜 林书祥 常艳敏 李迺昶		
发明人	李会强 侯丽英 朱黎娜 林书祥 常艳敏 李迺昶		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/582 G01N33/6803 G01N2333/70503		
代理人(译)	杨慧玲		
其他公开文献	CN103823069B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种血清特异性IgE生物学活性检测方法及其所使用的试剂盒，该方法以KU812细胞系为指示细胞，诱导表达IgE-Fc受体；将受试者血清与KU812细胞温育，促使血清中的待检sIgE与KU812细胞表面IgE-Fc受体结合；此时，加入特定过敏原，过敏原与KU812细胞表面sIgE结合，导致受体交联并激活KU812细胞，细胞脱颗粒并释放组织胺，同时促进细胞内的CD63分子转移到细胞膜表面。此时，用荧光素标记-抗CD63抗体进行细胞免疫染色，采用流式细胞仪测定表达CD63细胞的百分比，最终确定KU812细胞激活强度。本发明的有益效果是该方法可以评估患者接触过敏原发生过敏的风险程度，同时也可用于评估特异性脱敏治疗的临床效果。