



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113125744 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 201911401425.2

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 江苏众红生物工程创药研究院有限
公司

地址 213125 江苏省常州市新北区云河路
518号

(72)发明人 马永 范宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54)发明名称

脱敏治疗药物的活性检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种脱敏治疗药物的活性检测方法,为其质量控制提供方法学依据。体外测定IgE以确定脱敏治疗药物总生物学活性的方法主要有放射性变应原吸附性实验(RAST抑制试验)、免疫印迹试验等,但这些方法仍然无法做到变应原制剂活性的标准化检测。本发明建立了一种新型的脱敏治疗药物活性定量检测方法,包括标准血清库建立、血清IgE抑制率测算、变应原蛋白活性测算等步骤。该检测方法重复性好、准确度高,可以有效地反应脱敏治疗药物生物学活性,对脱敏治疗药物的生产工艺研究、质量控制具有重要意义。

1. 一种变应原蛋白活性检测方法,其特征在于,包含以下步骤:

步骤一、收集100份以上特异性IgE检测值为10~150Kua/L的血清进行合并,制备得到标准血清库,再测定标准血清库IgE值;

步骤二、包被:用包被液将变应原蛋白样品稀释后加入包被孔中孵育;

步骤三、封闭:洗涤包被孔,并加入封闭液孵育;

步骤四、样品稀释:待测变应原蛋白样品梯度稀释;

步骤五、混合孵育:将上述稀释的样品分别与血清混合孵育;

步骤六、加样孵育:孵育好的样品加入包被孔,继续孵育;

步骤七、二抗孵育:包被孔洗涤后加入二抗,孵育;

步骤八、显色读数;

步骤九、计算生物活性值:抑制率%=(阳性值-样品值)/阳性值,以抑制率%作为横坐标,以 Log_{10} 稀释倍数为纵坐标,做二次曲线拟合;将50%抑制率代入曲线方程,计算出稀释倍数;生物学活性值(BU/ml)=稀释倍数 $\times$ 100;比活(BU/mg)=生物学活性值/蛋白浓度。

其中,阳性值:血清中总游离特异性IgE与包被蛋白结合时的检测值。样品值:血清中游离特异性IgE(总特异性IgE-被不同稀释倍数的样品结合掉的IgE含量)与包被蛋白结合的检测值;

2. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述包被步骤,尘螨变应原蛋白包被反应条件选择4℃孵育过夜;I型尘螨变应原蛋白包被缓冲液为碳酸缓冲液或磷酸缓冲液;II型尘螨变应原蛋白包被缓冲液为磷酸缓冲液。

3. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述样品稀释步骤,尘螨变应原蛋白样品稀释至20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后再进行梯度稀释。

4. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述样品稀释步骤,I型尘螨变应原蛋白稀释后进行3倍梯度稀释;II型尘螨变应原蛋白稀释后进行6倍梯度稀释。

5. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述混合孵育步骤,I型尘螨变应原蛋白与11倍稀释度的血清混合孵育;II型尘螨变应原蛋白与5倍稀释度的血清混合孵育。

6. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述加样孵育步骤,蛋白与血清混合样品加入包被孔后孵育2小时。

脱敏治疗药物的活性检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种脱敏治疗药物的活性检测方法。

背景技术

[0002] 1998年WHO正式宣布检测变应原并进行特异性免疫治疗是唯一可以影响过敏性疾病自然进程的对因治疗方法。特异性免疫治疗是确定导致患者过敏的变应原种类后,在非急性期使患者与该种类变应原制剂反复接触,剂量由小到大逐渐递增,至最佳维持剂量,提高患者对变应原的耐受性,从而达到控制或减轻过敏症状的一种疗法。

[0003] 变应原制剂是将从变应原天然成分中提取或通过基因重组技术制备得到的变应原蛋白,制成一定浓度的溶液,用于诊断、预防和治疗生物制品。变应原生物学活性测定是质量控制的一项重要指标,也是目前变应原制品质量控制的重点和难点。生物单位(biological unit,BU)、生物等效变应原反应单位(bioequivalent allergy unit,BAU),是欧美使用的体内生物学评价单位,以过敏患者皮试结果来标定,反映变应原制品的总活性效价。体外测定IgE以确定变应原总生物学活性的方法有放射性变应原吸附性实验(RAST抑制试验)、免疫印迹试验等。由于缺乏不同批次间稳定的血清池,这些方法仍然无法做到变应原制剂的标准化。

[0004] 目前国内外尚无统一、标准化的用于脱敏治疗的变应原活性检测方法,所以建立一种变应原制品生物学活性检测方法,用于制备标准化的变应原尤为迫切。

发明内容

[0005] 本发明的目的是建立一种用于脱敏治疗的变应原蛋白活性检测方法,为其质量控制提供方法学依据。

[0006] 首先建立标准血清库,并对其进行赋值;将变应原蛋白包被在酶标板;将变应原蛋白样品系列稀释后与血清库血清孵育;孵育后的混合物加于预包被了变应原蛋白的酶标板中;建立起“抑制率-稀释倍数”的线性关系,并规定抑制率为50%的生物学活性为100BU/ml,即可计算出变应原蛋白的生物学活性。

[0007] 具体地,首先,利用Phadia100过敏原检测系统对每份血清DP和DF特异性IgE含量进行精确测定;按照正态分布原则,将特异性IgE检测值为10~150Kua/L进行合并,制备得到标准血清库;再次利用Phadia100过敏原检测系统对标准血清库中DP和DF特异性IgE含量进行精确测定,作为后续方法开发和验证的标准血清库。

[0008] 后续测定方法具体包括以下步骤:

[0009] 包被:用包被液将变应原蛋白样品稀释后加入包被孔中孵育;

[0010] 封闭:洗涤包被孔,并加入封闭液孵育;

[0011] 样品稀释:待测变应原蛋白样品梯度稀释;

[0012] 混合孵育:将上述稀释的样品分别与血清混合孵育;

[0013] 加样孵育:孵育好的样品加入包被孔,继续孵育;

[0014] 二抗孵育:包被孔洗涤后加入二抗,孵育;

[0015] 显色读数;

[0016] 计算:抑制率%=(阳性值-样品值)/阳性值,以抑制率%作为横坐标,以 Log_{10} 稀释倍数为纵坐标,做二次曲线拟合;将50%抑制率代入曲线方程,计算出稀释倍数;生物学活性值(BU/ml)=稀释倍数 $\times$ 100;比活(BU/mg)=生物学活性值/蛋白浓度。

[0017] 其中,阳性值:血清中总游离特异性IgE与包被蛋白结合时的检测值。样品值:血清中游离特异性IgE(总特异性IgE-被不同稀释倍数的样品结合掉的IgE含量)与包被蛋白结合的检测值;稀释蛋白与血清中游离IgE结合能力越弱,血清中游离的特异性IgE越多,包被蛋白结合的游离IgE也越多,检测值越高。稀释倍数:对样品进行不同倍数的稀释,不同稀释倍数的蛋白与血清中游离的特异性IgE结合能力不同,从而可以得到一条标准曲线。

[0018] 此外,根据尘螨变应原蛋白I(DP1、DF1)和II(DP2、DF2)型蛋白性质不同,我们对活性检测方法进行了系统的条件优化,获得定量更准确的活性检测方法。

[0019] 作为优选,在包被步骤,尘螨变应原蛋白包被反应条件选择4℃孵育过夜;I型尘螨变应原蛋白包被缓冲液为碳酸缓冲液或磷酸缓冲液;II尘螨变应原蛋白包被缓冲液为磷酸缓冲液。

[0020] 作为优选,在样品稀释步骤,尘螨变应原蛋白样品稀释至20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后再进行梯度稀释,方法重复性较好, Log_{10} 稀释倍数vs抑制率曲线的 R^2 值大于0.95,不同批次变应原蛋白活性检测拟合曲线可重现,同种蛋白重复检测结果的CV值符合偏差范围内。

[0021] 作为优选,在样品稀释步骤,I型尘螨变应原蛋白稀释后进行3倍梯度稀释;II型尘螨变应原蛋白稀释后进行6倍梯度稀释。

[0022] 作为优选,在混合孵育步骤,I型尘螨变应原蛋白与11倍稀释度的血清混合孵育;II型尘螨变应原蛋白与5倍稀释度的血清混合孵育。

[0023] 作为优选,在加样孵育步骤,蛋白与血清混合样品加入包被孔后孵育2小时。

[0024] 由于国内外尚没有一个统一、准确的变应原蛋白药物生物活性检测方法,本发明建立了一种新型的变应原蛋白药物活性定量检测方法,并筛选出I和II型尘螨蛋白适宜的检测方法。该检测方法重复性好、准确度高,可以有效地反应变应原蛋白药物生物学活性,对变应原蛋白药物的生产工艺研究、质量控制具有重要意义。

附图说明

[0025] 图1:Phadia100校准品标准曲线

[0026] 图2:不同检测值(Unicap值)的血清份数的正态分布图图3:优化前I和II型重组变应原蛋白活性检测结果

[0027] 其中图3-a、3-b、3-c、3-d分别是优化前rDP1、rDF1、rDP2、rDF2蛋白 Log_{10} (稀释倍数)对抑制率关系的曲线图

[0028] 图4:血清库不同稀释倍数优化结果

[0029] 其中图4-a、b、c分别是:血清库稀释度为原浓度、5倍、11倍时活性检测曲线图

[0030] 图5:II型变应原蛋白不同起始稀释倍数优化结果:

[0031] 其中图5-a、5-b、5-c、5-d分别是II型变应原蛋白样品稀释1000倍、500倍、200倍、50倍时活性检测曲线图

[0032] 图5-e、5-f分别是多批次DP2、DF2变应原蛋白活性检测的Log₁₀(稀释倍数)对抑制率关系的曲线图

[0033] 图6:不同包被缓冲液条件下Log₁₀(稀释倍数)对抑制率关系的曲线图

[0034] 图7:II型蛋白稀释梯度优化结果

[0035] 其中图7-a、b、c分别是:II型蛋白稀释梯度为10倍、5倍、3倍时活性检测曲线图图8:I型蛋白不同起始稀释倍数优化结果

[0036] 其中图8-a、8-b、8-c、8-d分别是:I型变应原蛋白样品稀释1000倍、500倍、200倍、50倍时活性检测曲线图

[0037] 图9:I型蛋白不同稀释梯度Log₁₀(稀释倍数)对抑制率关系的曲线图

[0038] 其中图9-a、9-b、9-c、9-d分别是:I型变应原蛋白样品按照3倍、4倍、6倍、10倍梯度进行稀释时活性检测曲线图

[0039] 图9-e、9-f分别是:多批次rDP1、rDF1变应原蛋白活性检测的Log₁₀(稀释倍数)对抑制率关系的曲线图

具体实施方式

[0040] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,应理解,引用实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0041] 实施例1标准血清库的建立

[0042] 1、Phadia100系统检测标准品:得到如图1和表1所示的标准曲线;由表1可知标准曲线实际检测值与理论含量基本一致, CV值<5%。

[0043] 表1.标准曲线检测值

[0044]

校准品理论含量(Kua/L)	0.00	0.35	0.70	3.50	17.5	100
校准品实际检测值-1(Kua/L)	0.002	0.35	0.70	3.49	17.3	101
校准品实际检测值-2(Kua/L)	0.00	0.34	0.71	3.50	17.7	99.4
校准品平均值(Kua/L)	0.001	0.35	0.70	3.49	17.5	100.0
CV值(%)	—	1.6	1.2	0.0	1.7	0.0

[0045] 2、Phadia100系统检测血清中DP和DF特异性IgE含量:检测结果如图2所示,图2显示了不同特异性IgE含量的血清分布,DP和DF各半。

[0046] 等体积合并混合共约500份血清,此血清库来自华东、华北和东北等不同地域的四家以上医院。

[0047] 4、混合血清库赋值:Phadia100系统检测质控品、血清库的DP和DF特异性IgE含量,结果如表2所示。检测结果显示标准血清库的特异性IgE含量在正态分布的中间值,具有代表性,可用于活性检测方法的开发、验证及变应原蛋白活性的检测。

[0048] 表2.质控品及标准血清库特异性DP和DF的IgE含量

[0049]		质控品-1	质控品-2	判定结果
	质控品理论含量(Kua/L)	0.50	15.0	—
	质控品实际检测值-1(Kua/L)	0.50	—	合格
	质控品实际检测值-2(Kua/L)	—	15.0	合格
	标准血清库样品检测结果			
		特异性DP IgE 含量(Kua/L)	特异性DF IgE 含量(Kua/L)	
	第一次检测	72.5	90.3	
	第二次检测	68.0	93.1	
	血清库平均值	70.25	91.7	

[0050] 实施例2优化前重组尘螨变应原蛋白活性检测方法

[0051] 具体步骤为(以重组尘螨蛋白rDP2为例)：

[0052] 1、包被：使用包被液(pH 9.620mM碳酸盐缓冲液)将rDP2样品稀释至2μg/ml, 100μl/孔, 4℃孵育过夜。

[0053] 2、封闭：PBST(pH7.40.15M PBS+0.05%Tween20)洗3次，拍干，每孔加入200μl封闭液(2%BSA/PBST)，37℃孵育2h。

[0054] 3、样品稀释：将rDP2样品用PBS进行1000倍稀释，稀释后浓度为1μg/mL，然后进行3倍梯度稀释(PBST缓冲液)，共7个稀释度。取各个稀释度的样品和血清库血清等体积混合，即150μl样品+150μl血清，混合后的样品放入4℃孵育过夜。阳性对照：150μl PBST稀释液+150μl血清。

[0055] 4、加样：混合孵育好的样品加入相应的包被孔中，37℃孵育90min。

[0056] 5、二抗孵育：PBST洗4次，拍干，每孔加入100μl二抗稀释液(鼠抗人IgE-HRP 1:1500稀释)，37℃孵育1h。

[0057] 6、显色：PBST洗4次，拍干，每孔加入100μl TMBI显色液，37℃显色10min。

[0058] 7、终止及读数：每孔加入50μl 2M H₂SO₄终止反应，450nm波长处读数。

[0059] 8、数据处理：抑制率%=(阳性值-样品值)/阳性值，以抑制率%作为横坐标，以Log₁₀稀释倍数为纵坐标，做二次曲线拟合；将50%抑制率代入曲线方程，计算出稀释倍数；生物学活性值(BU/ml)=稀释倍数×100；比活(BU/mg)=生物学活性值/蛋白浓度。

[0060] 9、结果分析：图3拟合曲线线性较差，批次间数据CV值>50%。

[0061] 实施例3重组II型尘螨变应原蛋白血清库稀释倍数优化

[0062] 其他步骤同实施例2。样品稀释：将蛋白样品用PBS稀释进行1000倍稀释至1μg/mL，后进行3倍梯度稀释(PBST缓冲液)，共7个稀释度。取各个稀释度的样品和稀释度为0、5和11倍的血清库血清等体积混合，4℃孵育过夜。阳性对照：150μl PBST稀释液+150μl血清。

[0063] 结果分析：图4-a显示血清库稀释度为原浓度时，抑制率范围为6%-54%；图4-b显示血清库稀释度为5时，抑制率范围为3%-67%；图4-c显示血清库稀释度为11时，抑制率范围为4%-84%；稀释度为原液和5时，最大抑制率偏低，稀释度为11较适宜。

[0064] 实施例4重组II型尘螨变应原蛋白包被反应条件的选择

[0065] 包被：分别使用包被液(pH 9.6 20mM碳酸盐缓冲液)将尘螨变应原蛋白rDP2样品稀释至2μg/ml, 100μl/孔，分别4℃孵育过夜和37℃孵育2h。

[0066] 其他步骤同实施例2。

[0067] 结果分析:表3中数据显示反应条件为37℃,2h时,抑制率区间偏小,最终蛋白比活值偏小。选择4℃过夜反应条件更优。

[0068] 表3.包被反应时间和温度的选择

[0069]	反应条件	抑制率%	50%抑制率对应的log稀释倍数	比活(BU/mg)
	37℃ 2h	20%-63%	2.36	2.32×10^4
	4℃过夜	29%-93%	3.34	2.15×10^5

[0070] 实施例5重组II型尘螨变应原蛋白稀释倍数的优化

[0071] 其他步骤同实施例2。

[0072] 样品稀释:将rDP2样品用PBS50、200、500和1000倍稀释,稀释至浓度分别为20μg/mL、5μg/mL、2μg/mL和1μg/mL,后用PBST进行3倍梯度稀释,共7个稀释度。取各个稀释度的样品和11倍稀释(PBST稀释液)的血清库血清等体积混合,即150μl样品+150μl血清,混合后的样品放入4℃孵育过夜。阳性对照:150μlPBST稀释液+150μl血清。

[0073] 结果分析:图5-a至图5-d显示将蛋白稀释倍数调整为50倍(蛋白起始浓度为20μg/mL),拟合曲线较好, R^2 值大于0.95;且经多批次验证,图5-e和图5-f显示每批蛋白活性检测可重复,CV值<10%。

[0074] 实施例6重组II型尘螨变应原蛋白包被缓冲液的优化

[0075] 包被:用包被液(pH 9.6 20mM碳酸盐缓冲液和pH 7.2 50mM磷酸盐缓冲液)将rDP2尘螨变应原蛋白稀释至2μg/ml,100μl/孔,4℃孵育过夜。

[0076] 其余操作步骤同实施例2一致。

[0077] 4结果分析:图6显示两种缓冲液均可用,碳酸盐缓冲液更优。

[0078] 实施例7重组II型尘螨变应原蛋白稀释梯度优化

[0079] 其他步骤同实施例2。样品稀释:将DP2样品稀释至20μg/mL,后进行3、5、10倍梯度稀释,共7个稀释度。取各个稀释度的样品和稀释度为11倍的血清库血清等体积混合,4℃孵育过夜。

[0080] 结果分析:图7结果表明蛋白样品稀释梯度为3倍时,拟合曲线更优。

[0081] 实施例8重组II型尘螨变应原蛋白与血清混合样品加入孔板后孵育时间的选择

[0082] 其他步骤同实施例2。加样:混合孵育好的样品加入相应的包被孔中,37℃分别孵育0.5h、1h、2h和4h。

[0083] 结果分析:表4中显示孵育时间为0.5h,抑制率为16%-42%,最大抑制率低于50%,无法计算,随着孵育时间延长,抑制率增加至83%左右,包含50%抑制率, R^2 也有0.90上升至0.98,但并不是孵育时间越长越好,孵育时间为2h左右时,抑制率范围为17%-83%, $R^2=0.98$,拟合曲线更优。

[0084] 表4.蛋白样品与血清混合物加样后孵育时间的选择

[0085]	孵育时间	抑制率%	拟合曲线 R^2	比活(BU/mg)
	0.5h	16%-42%	0.90	4.05×10^6

[0086]	1.0h	21%-62%	0.94	4.21×10^6
	2.0h	17%-83%	0.98	5.94×10^6
	4.0h	29%-74%	0.96	5.46×10^6

[0087] 实施例9优化后活性测定方法对重组II型尘螨变应原蛋白活性的测定

[0088] 1、包被：使用包被液 (pH 9.6 20mM碳酸盐缓冲液) 将rDP2和rDF2样品稀释至 $2\mu\text{g}/\text{ml}$, $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 孵育过夜。

[0089] 2、封闭：PBST (pH7.4 0.15M PBS+0.05% Tween20) 洗3次，拍干，每孔加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液 (2% BSA/PBST), 37°C 孵育2h。

[0090] 3、样品稀释：将样品用PBS进行50倍稀释，稀释后浓度为 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然后进行3倍梯度稀释 (PBST缓冲液)，共7个稀释度。取各个稀释度的样品和稀释度为11的血清库血清等体积混合，即 $150\mu\text{l}$ 样品+ $150\mu\text{l}$ 血清，混合后的样品放入 4°C 孵育过夜。阳性对照： $150\mu\text{l}$ PBST稀释液+ $150\mu\text{l}$ 血清。

[0091] 4、加样：混合孵育好的样品加入相应的包被孔中， 37°C 孵育2小时。

[0092] 其余操作步骤同实施例2一致。

[0093] 结果分析：如表5所示，连续3批次DP2和DF2变应原蛋白活性检测结果显示CV值远小于方法优化前。

[0094] 表5. II型变应原蛋白连续三批次活性测定结果

检测结果(BU/mg)	II型蛋白	第一次检测	第二次检测	第三次检测	CV%
[0095]	rDP2	2.70×10^5	1.63×10^5	2.82×10^5	27.49
	rDF2	1.08×10^5	1.33×10^5	7.53×10^4	26.79

[0096] 实施例10重组I型尘螨变应原蛋白包被浓度、包被缓冲液和血清稀释倍数的优化

[0097] I型尘螨变应原蛋白样品在条件优化前阳性值较低，导致拟合曲线线性较差，本实施例对I型蛋白的包被浓度、包被缓冲液种类和血清稀释倍数进行优化，考察范围如表6所示。

[0098] 表6. I型尘螨蛋白包被浓度、缓冲液及血清稀释倍数

[0099]	包被浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2/10/20
	包被缓冲液	50mM 磷酸盐缓冲液, pH7.2 20mM 碳酸盐缓冲液, pH9.6
	血清稀释倍数	11/5

[0100] 1、包被：按表6中所示条件，分别考察不同包被液缓冲液、不同包被蛋白浓度及不同血清稀释倍数， $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 孵育过夜。

[0101] 2、封闭：PBST洗3次，拍干，每孔加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 孵育2h。

[0102] 3、加样：血清稀释11、5倍

[0103] 4、其余操作步骤同实施例2一致。

[0104] 5、结果分析：表7显示阳性OD值与蛋白包被浓度呈正相关，但区别不大，优选蛋白包被浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ；和血清稀释倍数呈负相关，优选5倍稀释；采用碳酸盐缓冲液包被时，不同样品之间的阳性OD值差异较大；而采用磷酸盐溶液包被，阳性OD值提高7-10倍，不同蛋白

样品之间差异较小,故磷酸盐缓冲液包被更优。

[0105] 表7.I型蛋白样品包被缓冲液种类和血清稀释倍数优化结果

[0106]

包被缓冲液	碳酸盐缓冲液			磷酸盐缓冲液		
包被浓度(μg/ml) 血清稀释倍数	2	10	20	2	10	20
11	0.116	0.167	0.194	1.107	1.332	1.405
5	0.154	0.278	0.374	1.614	1.760	1.815

[0107] 实施例11重组I型尘螨变应原蛋白样品稀释倍数

[0108] 1、包被:用包被液 (pH7.2 50mM磷酸盐缓冲液) 将rDP1稀释至 $2\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{l}$ /孔, 4°C 孵育过夜。

[0109] 2、封闭:PBST (pH7.4 0.15M PBS+0.05% Tween20) 洗3次, 拍干, 每孔加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液 (1% BSA/PBST), 37°C 孵育2h。

[0110] 3、样品稀释:将I型蛋白起始样品用PBS分别进行50、200、500和1000倍稀释, 稀释后浓度分别为 $20\mu\text{g/mL}$ 、 $5\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 和 $1\mu\text{g/mL}$, 后用PBST进行3倍梯度稀释, 共7个稀释度。取各个稀释度的样品和5倍稀释 (PBST稀释液) 的血清库血清等体积混合, 即 $150\mu\text{l}$ 样品+ $150\mu\text{l}$ 血清, 混合后的样品放入 4°C 孵育过夜。阳性对照: $150\mu\text{l}$ PBST稀释液+ $150\mu\text{l}$ 血清。

[0111] 4、其余操作步骤同实施例2一致。

[0112] 5、结果分析:图8显示蛋白样品稀释200、500和1000倍时, 最高浓度的抑制率偏低, 将稀释倍数将至50倍 ($20\mu\text{g/mL}$), 拟合曲线更佳。

[0113] 实施例12重组I型尘螨变应原蛋白样品稀释梯度

[0114] 1、包被:用包被液 (pH7.2 50mM磷酸盐缓冲液) 将rDP1稀释至 $2\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{l}$ /孔, 4°C 孵育过夜。

[0115] 2、封闭:PBST洗3次, 拍干, 每孔加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 孵育2h。

[0116] 3、样品稀释:将I样品稀释至 $20\mu\text{g/mL}$, 后进行3、4、6、10倍梯度稀释, 共7个稀释度。取各个稀释度的样品和5倍稀释的血清库血清等体积混合。

[0117] 4、其余操作步骤同实施例2一致。

[0118] 5、结果分析:图9-a至9-d为考察稀释梯度3、4、6、10, 结果表明稀释梯度为6时更佳; 且经多批次验证, 图9-e和图9-f显示每批蛋白活性检测可重复, CV值 $<10\%$, 故I型蛋白活性检测选用磷酸盐缓冲液, 样品稀释至 $20\mu\text{g/mL}$ 再6倍梯度向下稀释检测结果可重复。

[0119] 实施例13优化后活性测定方法对重组I型尘螨变应原蛋白活性的测定

[0120] 1、包被:用包被液 (pH7.2 50mM磷酸盐缓冲液) 将rDP1和rDF1稀释至 $2\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{l}$ /孔, 4°C 孵育过夜。

[0121] 2、封闭:PBST洗3次, 拍干, 每孔加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 孵育2h。

[0122] 3、样品稀释:将样品稀释至 $20\mu\text{g/mL}$, 后进行6倍梯度稀释, 共7个稀释度。取各个稀释度的样品和5倍稀释的血清库血清等体积混合。

[0123] 4、其余操作步骤同实施例2一致。

[0124] 5、结果分析:如表8所示, 连续3批次DP1和DF1变应原蛋白活性检测结果显示CV值远小于方法优化前。

[0125] 表8.I型变应原蛋白连续三批次活性测定结果

检测结果(BU/mg) I型蛋白	第一次检测	第二次检测	第三次检测	CV%
rDP1	1.31×10^6	8.39×10^5	1.40×10^6	25.47
rDF1	1.16×10^6	1.51×10^6	1.35×10^6	13.08

[0127] 实施例14优化后重组尘螨变应原蛋白活性测定方法准确度验证

[0128] 采用实施例9方法测定高中低不同浓度rDP2和rDF2蛋白活性,验证方法准确度;采用实施例13方法测定高中低不同浓度(1.0、0.1、0.01mg/mL) rDP1和rDF1蛋白活性,验证方法准确度。

[0129] 结果如表9所示,高中低不同浓度样本检测值在80~120%范围(与蛋白标准活性相比的比值),方法准确度良好。

[0130] 表9.高中低不同浓度样品准确度测定结果

检测结果(BU/mg) 蛋白名称	高浓度	中浓度	低浓度	平均值	准确度(%)
rDP2	2.05×10^5	1.59×10^5	1.90×10^5	1.85×10^5	85.94~110.81%
rDF2	1.87×10^5	1.93×10^5	1.53×10^5	1.78×10^5	85.96~108.43%
rDP1	1.25×10^6	9.87×10^5	1.18×10^6	1.13×10^6	90.40~114.49%
rDF1	1.30×10^6	1.09×10^6	9.52×10^5	1.11×10^6	85.38~116.60%

[0132] 实施例15优化后重组尘螨变应原蛋白活性测定方法精密度验证

[0133] 采用实施例9方法测定同一批次4个不同样本rDP2和rDF2蛋白活性,验证方法批内精密度;测定连续三批rDP2和rDF2蛋白活性,测定批间精密度。

[0134] 采用实施例13方法测定同一批次4个不同样本rDP1和rDF1蛋白活性,验证方法批内精密度;测定连续三批rDP1和rDF1蛋白活性,测定批间精密度。

[0135] 结果分析:如表10-a所示为批内精密度结果,每批各浓度样品CV值<20%;表10-b所示为批间精密度结果,每批各浓度样品CV值<20%;

[0136] 表10-a.连续4批次样品批内精密度测定结果

检测结果(BU/mg) 蛋白名称	样本1	样本2	样本3	样本4	CV%
rDP2	2.25×10^5	1.93×10^5	2.09×10^5	1.78×10^5	10.07%
rDF2	1.08×10^5	1.33×10^5	8.53×10^4	9.59×10^4	19.44%
rDP1	9.25×10^5	9.93×10^5	1.09×10^6	1.28×10^5	14.39%
rDF1	1.08×10^6	1.33×10^6	9.15×10^5	9.59×10^5	17.34%

[0138] 表10-b.连续3批次样品批间精密度测定结果

检测结果(BU/mg) 蛋白名称	第一批次	第二批次	第三批次	CV%
rDP2	1.95×10^5	2.13×10^5	1.85×10^5	7.18%
rDF2	1.02×10^5	1.19×10^5	8.53×10^4	16.50%
rDP1	9.78×10^5	1.03×10^6	1.19×10^6	10.36%
rDF1	1.28×10^6	1.08×10^6	9.97×10^5	13.00%

[0140] 实施例16方法优化前后天然II型尘螨变应原蛋白活性的测定

[0141] 使用优化前方法测定nDP2、nDF2活性,参见实施例2,结果与实施例2类似,拟合曲线线性较差, $R^2 < 0.95$,或者曲线区间范围较窄,50%抑制率点在曲线边缘,由此计算得到的活性值不准确。

[0142] 使用优化后方法测定活性,参见实施例9,结果如表11所示,连续3批次nDP2和nDF2变应原蛋白活性检测结果显示CV值远小于方法优化前。且高中低不同浓度样本检测值在80~120%范围(与蛋白标准活性相比的比值),方法准确度良好。

[0143] 表11.II型变应原蛋白连续三批次活性测定结果

检测结果(BU/mg) II型蛋白	第一次检测	第二次检测	第三次检测	CV%
	nDP2	nDF2	nDP2	nDF2
nDP2	2.09×10^5	2.31×10^5	1.77×10^5	14.08
nDF2	1.98×10^5	2.33×10^5	1.53×10^4	21.54

[0145] 实施例6方法优化前后天然I型尘螨变应原蛋白活性的测定

[0146] 使用优化前方法测定nDP1、nDF1活性,参见实施例2,结果与实施例2类似,拟合曲线线性较差或者曲线区间范围较窄,由此计算得到的活性值不准确。

[0147] 使用优化后方法测定活性,参见实施例9,结果如表12所示,连续3批次nDP1和nDF1变应原蛋白活性检测结果显示CV值远小于方法优化前。且高中低不同浓度样本检测值在80~120%范围(与蛋白标准活性相比的比值),方法准确度良好

[0148] 表12.I型变应原蛋白连续三批次活性测定结果

检测结果(BU/mg) I型蛋白	第一次检测	第二次检测	第三次检测	CV%
	nDP1	nDF1	nDP1	nDF1
nDP1	1.65×10^6	2.19×10^6	1.74×10^6	22.58
nDF1	1.96×10^6	2.51×10^6	2.35×10^6	17.69

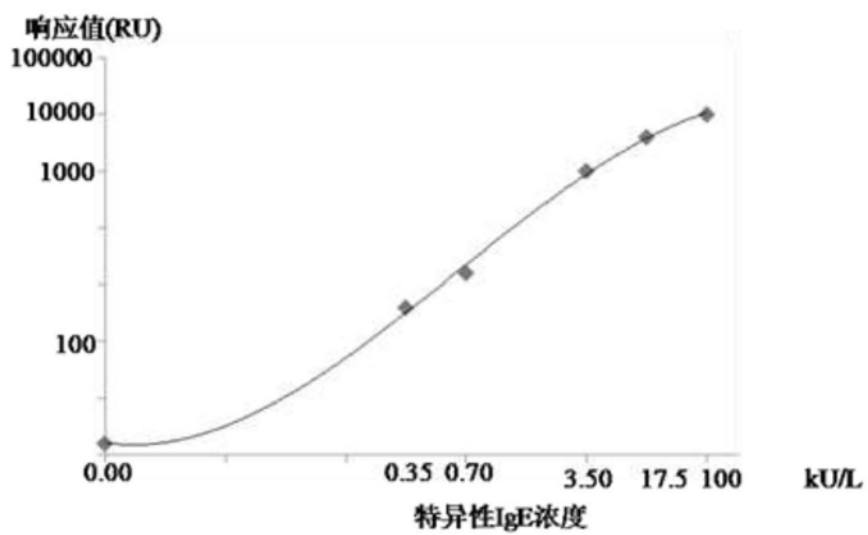


图1

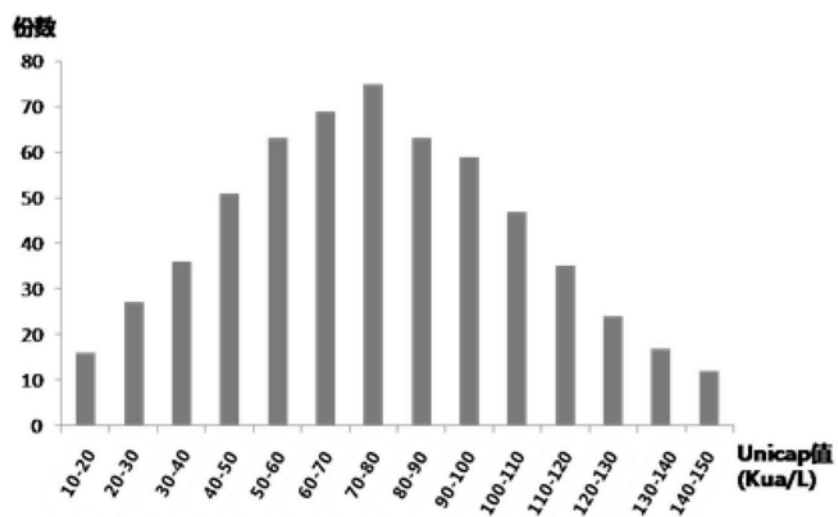


图2

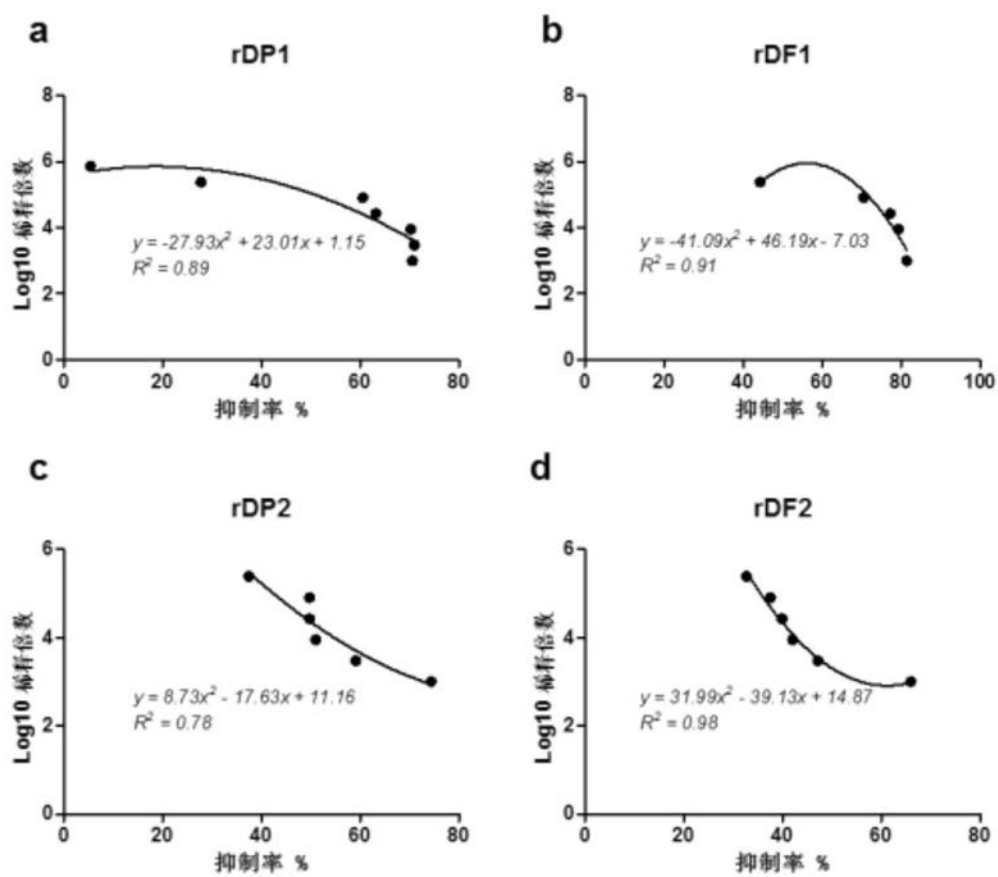


图3

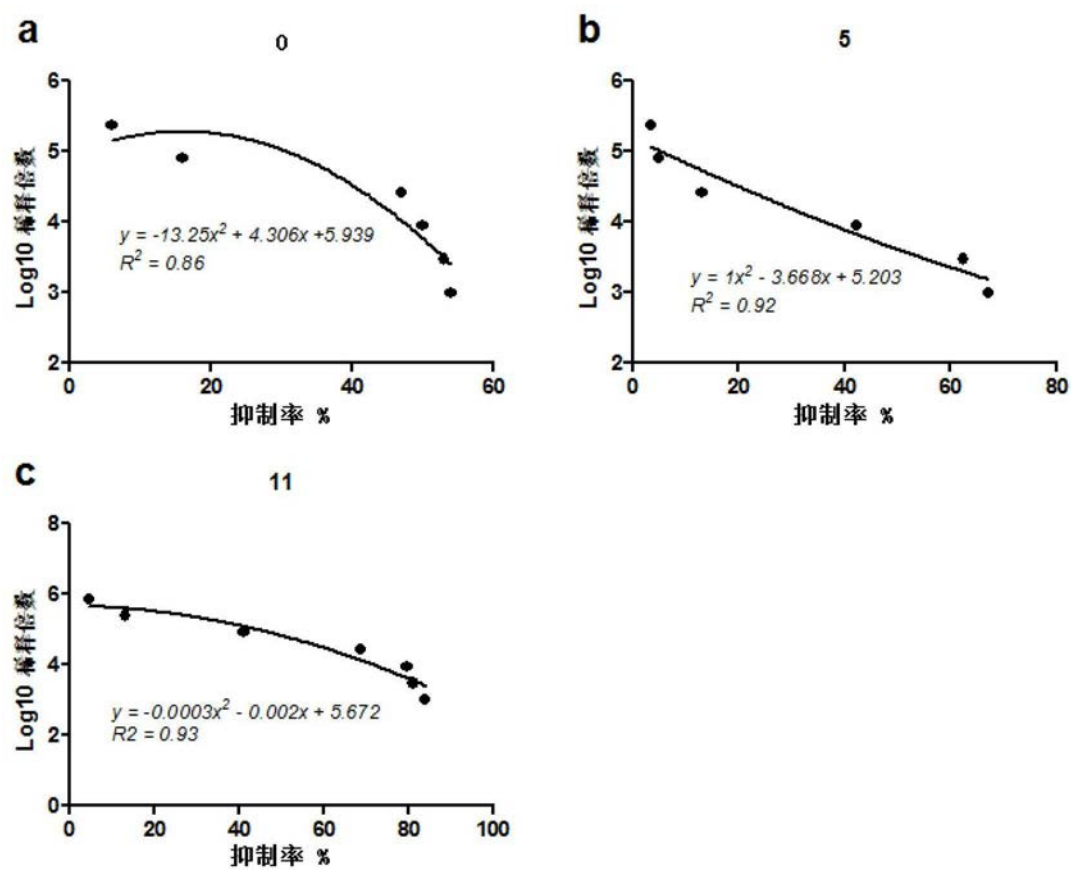


图4

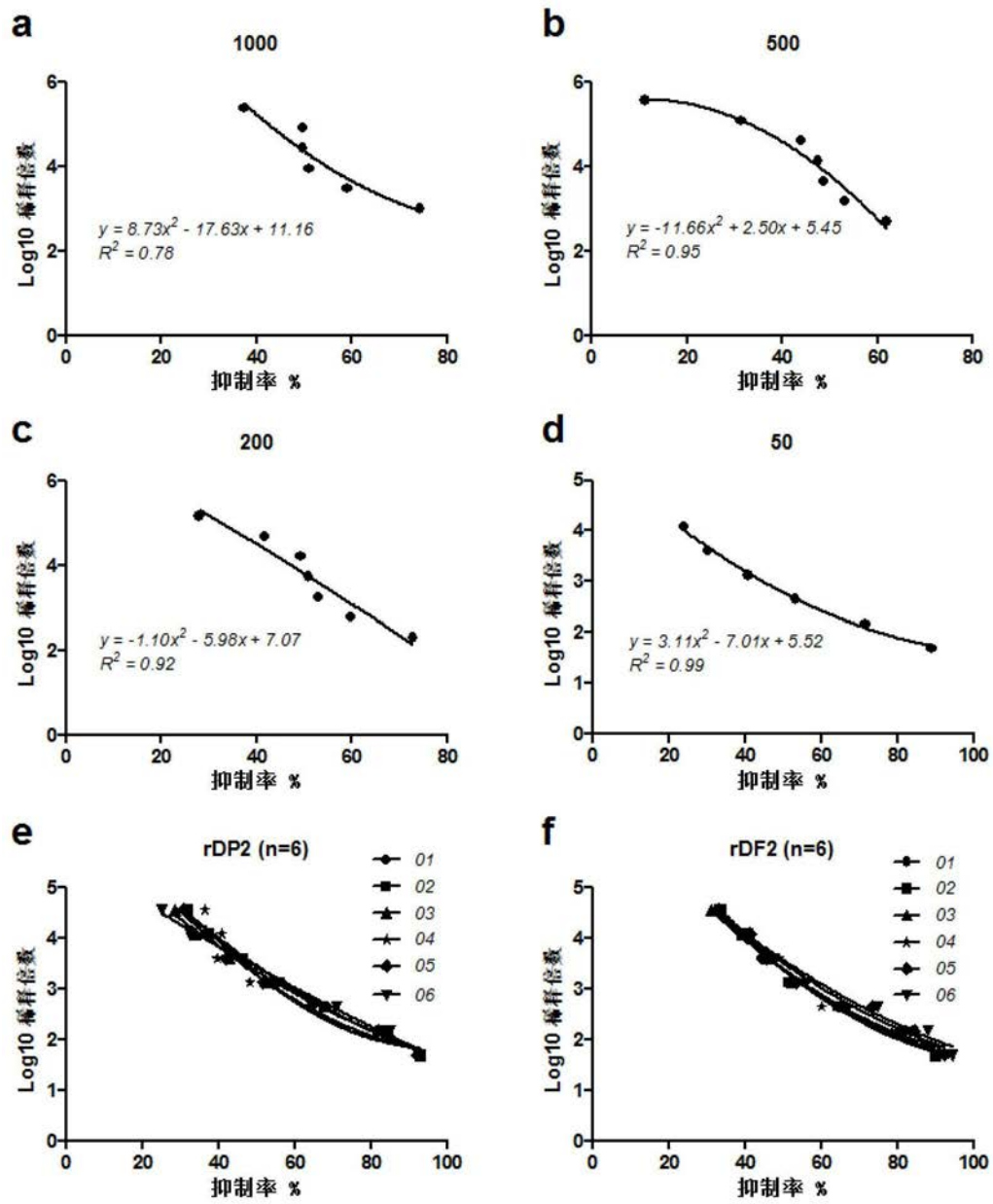


图5

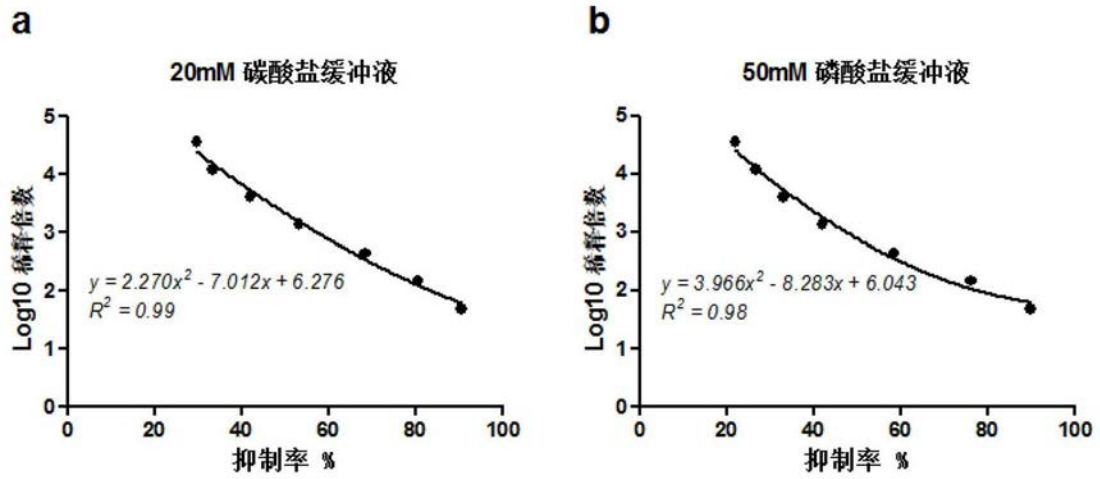


图6

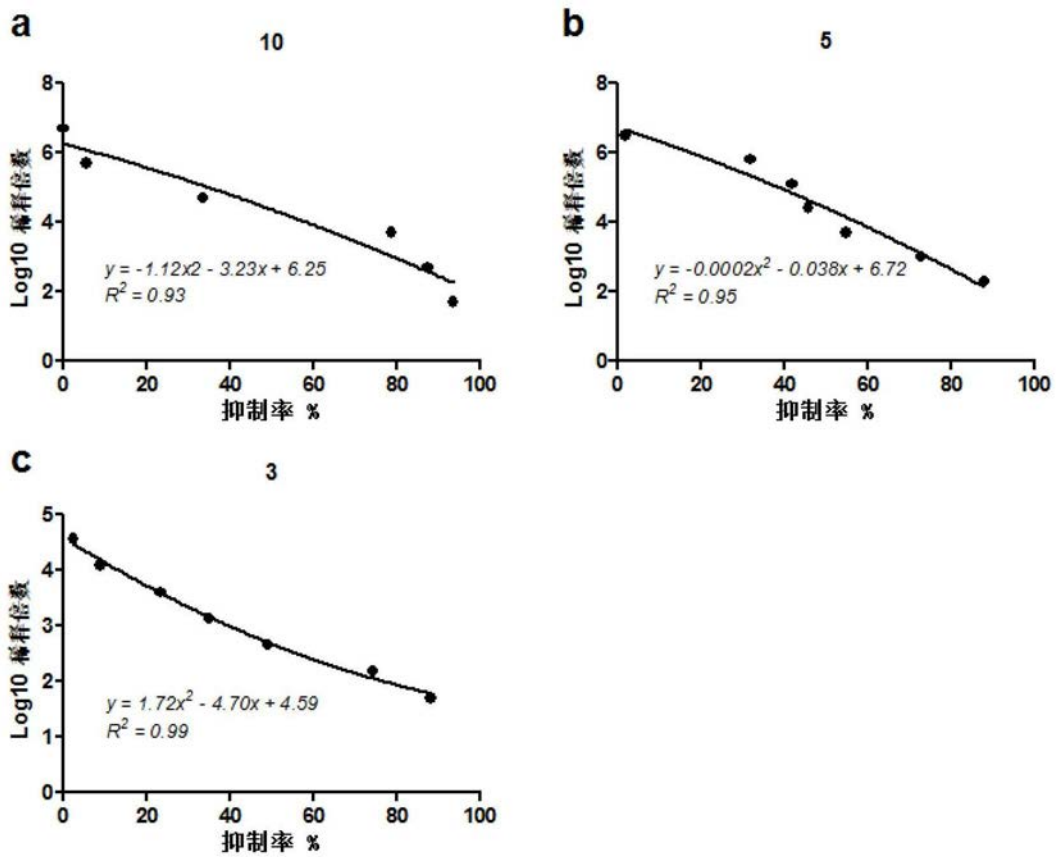


图7

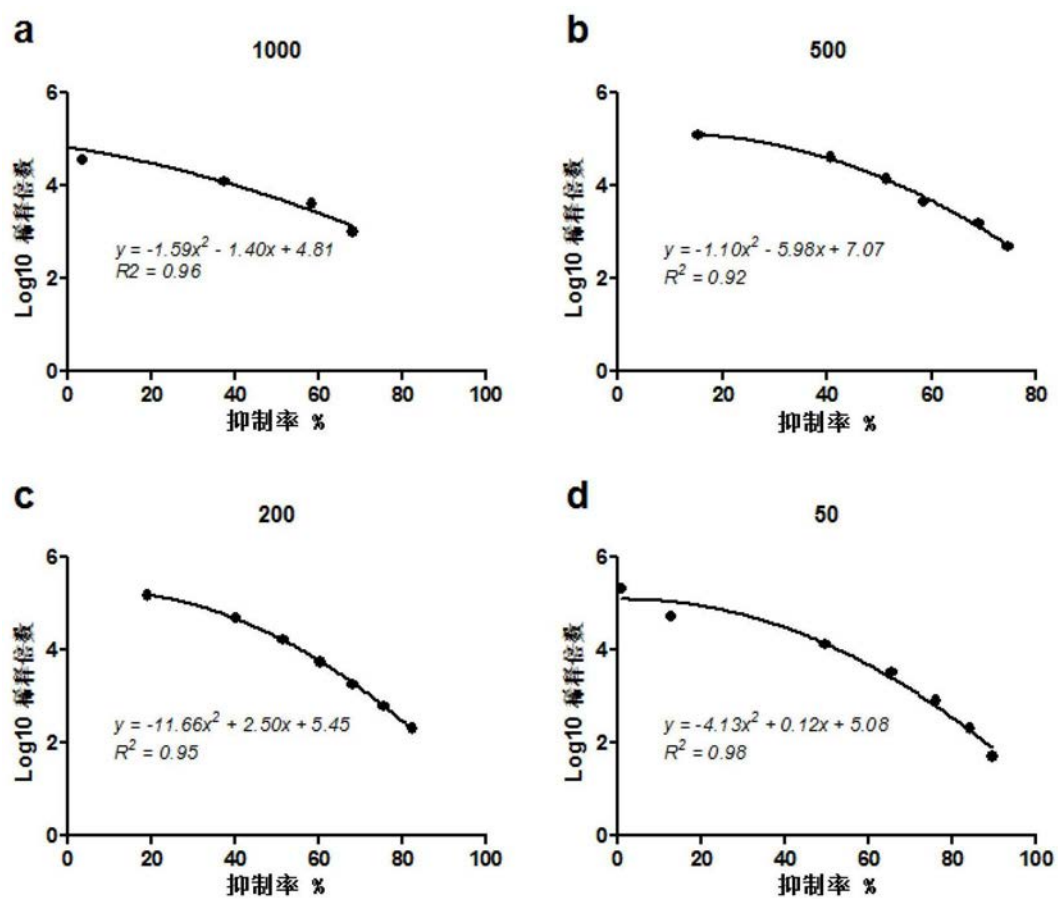


图8

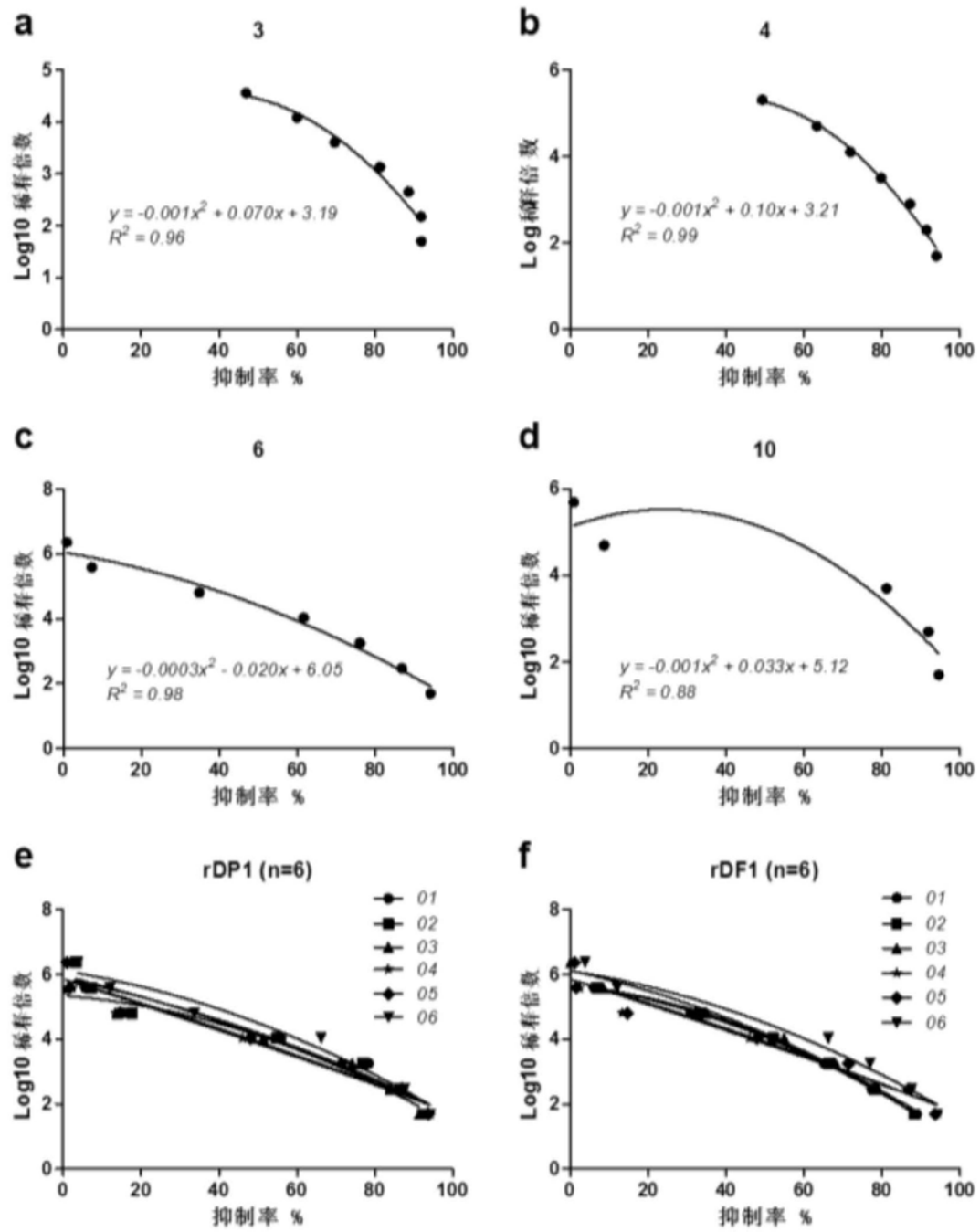


图9