(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118362736 A
(43)申请公布日 2024.07.19

(21)申请号 202311837305.3
(22)申请日 2023.12.28
(66)本国优先权数据
202310060844.4 2023.01.18 CN
(71)申请人 江苏晶红生物医药科技股份有限公司
地址 213125 江苏省常州市新北区云河路518号
申请人 江苏众红生物工程创药研究院有限公司
(72)发明人 丁娜 赵百学 高慧 朱梦仟 马永
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

权利要求书3页 说明书26页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

一种黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种化学发光法检测黄花蒿过敏原特异性IgE抗体的检测试剂盒，包括抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂、校准品和质控品，其采用特定的重组抗人IgE抗体，能够很好地匹配人IgE蛋白表位，抗干扰力强，均一性佳，更利于过敏原特异性IgE抗体检测，还对试剂的组成体系进行优化，提高了黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒的检测性能和质控属性，本发明试剂盒具有良好的线性范围、精密度、准确度和特异性，检测结果稳定可靠，为蒿属花粉过敏性疾病的精准诊断提供依据，操作简便，检测耗时短，可应用于全自动化学发光检测仪器，具有良好的临床应用前景。

CN 118362736 A

1.一种黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,包括抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂、标准品和质控品,还包括生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂。

2.如权利要求1所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂使用重链氨基酸序列为SEQ ID NO:16,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:18的重组抗人IgE抗体,生物素标记的抗人IgE抗体试剂使用重链氨基酸序列为SEQ ID NO:15,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:17的重组抗人IgE抗体。

3.如权利要求1或权利要求2所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,所述生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂中包含等质量比混合的重组黄花蒿主要过敏原蛋白Art a 1和Art a 3。

4.如权利要求1～3任一项所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中抗人IgE抗体包被的磁性微球的浓度为0.5～1.2mg/mL,所述生物素标记的抗人IgE抗体试剂中生物素标记的抗人IgE抗体浓度为0.05～0.2μg/mL,所述吖啶酯标记的链霉亲和素试剂中吖啶酯标记的链霉亲和素浓度为0.05～0.25μg/mL,所述标准品经过冷冻干燥,其复溶后包括6支不同浓度的人IgE蛋白溶液:0IU/mL、0.45IU/mL、0.76IU/mL、3.6IU/mL、20.8IU/mL、94.8IU/mL,所述质控品经过冷冻干燥,其复溶后包括2支不同浓度的人IgE蛋白溶液:1.0IU/mL、20.0IU/mL,所述生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂中黄花蒿过敏原溶液的浓度为0.025μg/mL～0.2μg/mL。

5.如权利要求1～4任一项所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂还包括缓冲液、稳定剂、保护剂、防腐剂、螯合剂,所述生物素标记的抗人IgE抗体试剂还包括缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂,所述吖啶酯标记的链霉亲和素试剂还包括缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂,所述复溶后的标准品还包括缓冲液、保护剂,所述复溶后的质控品还包括缓冲液、保护剂,所述生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂中还包括缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂。

6.如权利要求5所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,

所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,稳定剂为10～100g/L的蔗糖、海藻糖或葡萄糖,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,螯合剂为0.1～0.6g/L的EDTA;

所述生物素标记的抗人IgE抗体试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,稳定剂为5～100g/L的蔗糖、葡萄糖或海藻糖,表面活性剂为0～2mL/L的Tritonx 100,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白;

所述吖啶酯标记的链霉亲和素试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,稳定剂为10～100g/L的蔗糖、葡萄糖或海藻糖,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白;

所述复溶后的标准品中:缓冲液为pH6.0～7.5乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,保护剂为1～10g/L的人血清白蛋白或牛血清白蛋白或0.05～0.1L/L的山羊血清;

所述复溶后的质控品中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,保护剂为1～10g/L的人血清白蛋白或牛血清白蛋白或0.05～0.1L/L的山羊血清;

所述生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或

磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,稳定剂为5～100g/L的蔗糖、葡萄糖或海藻糖,表面活性剂为0～2mL/L的Tritonx 100,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白。

7.如权利要求1～6任一项所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中磁性微球为羧基磁性微球或甲苯磺氨基磁性微球(粒径:1.5μm～3.0μm)。

8.如权利要求1～7任一项所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,其特征在于,

所述抗人IgE抗体包被的磁性微球的制备过程为:

用0.02M乙磺酸缓冲液(pH5.0)将第一种重组抗人IgE抗体稀释至0.04mg/mL,制备成重组抗人IgE抗体稀释液;用0.02M乙磺酸缓冲液(pH5.0)将羧基磁性微球稀释至1mg/mL,再加入0.5%(质量浓度)的碳二亚胺(EDC),在25℃下振荡反应30min,反应结束后通过磁分离器去除未反应的EDC;然后加入1%(质量浓度)的上述重组抗人IgE抗体稀释液,在30℃下振荡反应30min,反应结束后通过磁分离器去除未反应的抗体,再加入由缓冲液、防腐剂、稳定剂、表面活性剂(如吐温20、曲拉通100等)组成的终止反应液终止反应,在37℃下振荡反应120min,反应结束后通过磁分离器收集磁性微球;最后加入包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、螯合剂的磁性微球保存缓冲液混匀,调整磁性微球质量浓度为0.5～1.2mg/mL;

所述生物素标记的抗人IgE抗体的制备过程为:

将第二种重组抗人IgE抗体以1:28摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,37℃条件下振荡反应30min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂的生物素标记物保存缓冲液,调整其浓度到0.05～0.2μg/mL;

所述吖啶酯标记的链霉亲和素的制备过程为:

将链霉亲和素以1:5摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的吖啶酯中,37℃条件下振荡反应30min,反应后的溶液用硫酸铵盐析法纯化,将沉淀反应液离心,取沉淀物,用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)重悬沉淀物(即吖啶酯标记的链霉亲和素),BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂的吖啶酯标记物保存缓冲液,调整其浓度到0.05～0.25μg/mL;

所述生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂的制备过程为:

将重组黄花蒿蛋白(Art a 1和Art a 3质量比为1:1的混合蛋白)以1:20摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,37℃条件下振荡反应20min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.05M,pH6.5)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用生物素标记物保存缓冲液调整其浓度到0.025μg/ml～0.2μg/ml。

9.如权利要求1～8任一项所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒定量检测血清中黄花蒿特异性IgE抗体的方法,包括以下步骤:

(1)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球、生物素标记的抗人IgE抗体与复溶后的标准品或者质控品,振荡混匀后,置于37℃反应20min,得到第一溶液,在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除第一溶液中未反应的生物素标记的抗人IgE抗体,得到第二溶液,形成抗人IgE抗体1-IgE-抗人IgE抗体2的双抗体夹心结构;

(2)向上述第二溶液中加入一定体积吖啶酯标记的链霉亲和素,振荡混匀后,置于37℃反应20min,得到第三溶液;在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除第三溶液中未反应的吖啶

酯标记的链霉亲和素和杂质,得到第四溶液;

(3)向上述第四溶液中加入化学发光底物,测定标准品及质控品的发光强度;

(4)根据标准品标示浓度和标准品发光强度绘制标准曲线;

(5)根据步骤(4)所得标准曲线将质控品的发光值换算成相应的浓度,获得质控结果;

(6)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球、生物素标记的黄花蒿过敏原溶液、检测样本,振荡混匀后,置于37℃反应20min,在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除中未反应的生物素标记的黄花蒿过敏原;

(7)向步骤(6)所得溶液中加入一定体积的所述吖啶酯标记的链霉亲和素,振荡混匀后,置于37℃反应20min,形成抗人IgE抗体-过敏原特异性IgE-过敏原的复合物;在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除未反应的吖啶酯标记的链霉亲和素和杂质;

(8)向步骤(7)所得溶液中加入化学发光底物,测定检测样本的发光强度;

(9)根据标准曲线将检测样本发光值换算成相应的浓度,获得检测样本中黄花蒿特异性IgE抗体的浓度。

10.如权利要求1~8任一项所述的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒在全自动化学发光免疫分析仪上定量检测黄花蒿特异性IgE抗体,包括以下步骤:

(1)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或者通过仪器配套软件设定;

(2)将所述复溶后的标准品、质控品放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,仪器自动识别或通过仪器配套软件编辑对应检测信息,按照程序自动检测,形成校准曲线和质控结果;

(3)将生物素标记的黄花蒿过敏原溶液放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或通过仪器配套软件设定;

(4)将检测样本放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,通过仪器配套软件编辑对应检测信息,仪器识别待测样本信息后,按照程序自动检测,并根据校准曲线计算样品中黄花蒿特异性IgE浓度。

一种黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫体外诊断领域,具体涉及一种黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 过敏性疾病又称变应性疾病,大多为免疫球蛋白E(Immunoglobulin E,IgE)介导的I型变态反应性疾病。过敏的发生可分为致敏和过敏两个阶段:致敏阶段,机体首次接触过敏原(又称变应原),触发B细胞产生过敏原特异性IgE抗体,此期间机体无任何异常反应;过敏阶段,当相同过敏原再次或多次进入致敏机体时,细胞表面的IgE受体与特异性IgE抗体结合,特异性IgE抗体再与过敏原结合引起过敏原交联,导致肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒并释放一系列生物活性物质,引起过敏反应(又称变态反应,Allergy)的疾病及相关症状,如过敏性哮喘、枯草热、荨麻疹、过敏性鼻炎、湿疹、结膜炎及胃肠道I型过敏性疾病及严重过敏反应等。

[0003] 过敏性疾病的发病率日益增高,已成为全球关注的公共卫生问题,世界卫生组织(WHO)将其列为21世纪重点研究和防治的疾病。过敏性疾病的病情呈复杂化趋势,研究表明单一过敏的儿童超五成存在进展成多重过敏的可能性,早期发生食物过敏或特应性皮炎的儿童将来可能发生其他更加难治性的过敏性疾病。针对过敏性疾病,WHO提出“四位一体”疗法:避免接触过敏原,对症药物治疗,特异性免疫治疗,医生及患者教育。其中,避免接触过敏原是指在查明过敏原的基础上,做好环境防控,尽量避免接触过敏原。在过敏性疾病的治疗过程中很好地避免接触过敏原不仅可以降低患者发生过敏的概率,还可提高药物疗效,帮助患者尽快脱敏。特异性免疫治疗,即脱敏治疗,是唯一可影响过敏性疾病自然进程,改变免疫应答机制的“对因”疗法,其通过对患者使用逐渐增加剂量的过敏原,提高患者对该过敏原的耐受性,减轻由暴露于该过敏原而引发的症状,最终达到耐受乃至免疫耐受的目的。可见,明确过敏原是防治过敏性疾病的关键,避免接触过敏原并开展特异性免疫治疗都离不开过敏原诊断。

[0004] 过敏原种类繁多,根据进入机体的途径可分为吸入性过敏原、食入性过敏原、接触性过敏原、输注性过敏原等。常见的吸入性过敏原如尘螨、花粉、真菌、动物皮屑等,常见的食入性过敏原如牛奶、鸡蛋、花生、小麦、大豆等,常见的接触性过敏原如橡胶、金属、油漆、化妆品、防腐剂、染料等,常见的输注性过敏原有青霉素、链霉素、生物制剂等,此外,还有很多通过其他途径进入机体的过敏原。过敏患者可能对单一过敏原过敏,也可能同时对多种过敏原过敏。

[0005] 在众多的过敏原中,尘螨和蒿属花粉是较为常见的过敏原。尘螨种类繁多,广泛存在于人类生活和工作环境中,其排泄物、代谢物及螨体均具有较强的变应原性,据统计全球约10%的人口对尘螨过敏,中国过敏性鼻炎患者约80%由尘螨引起,尘螨过敏性哮喘约占哮喘总人数的70~80%,尘螨已成为诱发过敏性疾病的重要过敏原。尘螨变应原组成复杂,约有30余种,其中户尘螨(学名Dermatophagoides pteronyssinus)和粉尘螨(学名

Dermatophagoides farinae)的I型变应原(Der p 1、Der f 1)和II型变应原(Der p 2、Der f 2)是最主要的致敏组分。蒿属(Genus Artemisia)花粉在空气中含量高,持续产生时间长,是引起夏秋季(从7月初到9月底)花粉症的重要变应原之一,全球约有300种以上的蒿属植物,广泛分布于北半球温带、温寒带及亚热带地区。国内一项2008-2010年215210次变应原特异性IgE检测结果显示,在吸入性变应原中,阳性率最高的为蒿花粉。杨琼梁等2015年研究结果表明中国北方地区最主要的致敏花粉为蒿属花粉。蒿属中的黄花蒿(学名Artemisia annua)和艾蒿(学名Artemisia vulgaris,又名北艾)是常见的花粉致敏植物,其I型变应原(Art a 1、Art v 1)和III型变应原(Art a 3、Art v 3)是主要致敏组分。

[0006] 通过过敏原检测可以筛查出引发过敏的物质,从而为过敏原的确诊提供依据,进行有针对性的预防和治疗。目前,临床上过敏原检测包括体内试验和体外试验两类。体内试验包括皮内试验、皮肤点刺试验、斑贴试验等。体内试验具有灵敏性和特异性较高的优势,但是过敏原直接接触皮肤或进入体内,存在诱发全身性反应的风险。此外,体内试验还需要在皮肤表面形成创伤或者长时间贴敷测试物,容易给患者带来身体痛苦或心理恐惧。体外试验包括血清总IgE抗体检测、过敏原特异性IgE抗体检测、特异性IgG4抗体检测、嗜碱性粒细胞活化试验等。体外试验取患者血液进行离体检测,过敏原并不直接作用于人体,可避免体内试验带来的危害和痛苦。临床诊断和治疗过敏性疾病通常需要结合体内体外试验,并连同临床病史和临床表现综合判断,以确定过敏原和致敏程度。

[0007] 由于IgE抗体在过敏性疾病的发生和发展中起着关键作用,因此IgE抗体检测对过敏性疾病的诊断具有非常重要的临床意义。血清总IgE抗体检测通过检测血中IgE抗体的总含量,初步判断患者是否存在I型过敏反应,当总IgE抗体水平超过正常指标时,提示患者处于高敏状态,可能患有IgE介导的过敏性疾病。但是总IgE抗体检测并不能用于确诊过敏性疾病,除过敏性疾病之外,自身免疫病、免疫系统缺陷病、寄生虫和微生物感染等也可导致血清总IgE抗体水平显著升高。此外,也存在过敏性疾病患者总IgE抗体水平正常的情况。过敏原特异性IgE检测通过检测患者血液中的过敏原特异性IgE含量来确定过敏物质,对过敏性疾病的确诊更具参考意义。过敏原特异性IgE检测还可进一步对过敏原组分,即致敏蛋白进行检测,实现精准诊断。过敏原特异性IgE检测具有特异性好、安全性高、耗时短、基本无创、痛苦小的优点,在临床上被广泛应用。

[0008] 临床上采用的体外检测人IgE抗体的方法主要有放射过敏原吸附试验法(RAST)、荧光酶免疫分析法(FEIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫印迹法(immunoblot)、化学发光免疫检测(CLIA)等。RAST法是最早使用的过敏原检测方法,该方法需要使用放射性同位素,存在放射污染,现已基本不再使用。ELISA法具有灵敏度高的优点,广泛应用于免疫分析领域,但是其重复性不好,特异性不高,干扰因素较多。FEIA在荧光免疫分析法(FIA)的基础上引入酶标记技术,具有灵敏度高、特异性强和不受主观因素影响的优点,但是,荧光酶免疫分析法目前主要依靠国外进口试剂,价格昂贵且耗时长。免疫印迹法和酶联免疫吸附法都存在耗时长,操作步骤复杂,对人员操作要求较高等不足。

[0009] 化学发光免疫检测法是近年快速发展的免疫检测法,应用于人IgE抗体检测具有自动化程度高、检测快速,灵敏度、精确度及特异性高,安全无害,血清用量更少等优点。化学发光法按反应类型可分为直接化学发光、酶促化学发光。直接化学发光的发光剂不需要酶催化作用,直接参与发光反应,其在化学结构上有产生发光的特有基团,可直接标记抗原

或抗体,目前常用的直接化学发光标记物主要有吖啶酯、三联吡啶钌等。酶促化学发光为间接发光,所使用的发光剂自身不带发光基团,需要利用酶物质进行催化发光,虽然有一定的灵敏度,但发光速度较慢,酶活性容易受外界干扰,其代表性的试剂有鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺等,激活酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等。

[0010] 过敏原特异性IgE抗体检测尚无国际标准,不同厂家的检测试剂所使用的过敏原和抗IgE抗体原料不同,结合到载体的方法和检测方法也不同,所以检测结果存在一定差异。采用FEIA法的ImmunoCAP系统(Thermo Fisher)与皮肤试验结果具有良好的相关性,因其准确地定量测定和可靠的重复性能等被业内视为IgE抗体体外检测的“金标准”,常被用作方法学的比对。此外,由于IgE抗体在血清中的含量非常低,现有检测试剂盒难以提供足够的灵敏度,尤其是检测微量的特异性IgE抗体时,检测结果的准确性普遍不高,难以达到“金标准”的水平。

[0011] 鉴于化学发光法人IgE抗体检测的应用前景以及现有人IgE抗体检测试剂盒存在的问题,临床上有待开发检测性能优异,操作简便,通量高,检测耗时短,适合于各种过敏原特异性IgE检测且能够降低检测成本的化学发光人IgE抗体检测方法和检测试剂盒。

发明内容

[0012] 为解决上述人IgE抗体检测所面临的问题,本发明提供一种重组抗人IgE抗体和另一种重组抗人IgE抗体,组合应用于化学发光法人IgE抗体检测以提高检测性能;本发明还提供一种使用上述重组抗人IgE抗体的化学发光法人IgE抗体检测试剂盒,具有良好的检测性能和质控属性,适用于各种过敏原特异性IgE抗体的定量检测。

[0013] 本发明提供的第一种重组抗人IgE抗体,其重链可变区各互补决定区的氨基酸序列为:

[0014] SEQ ID NO:6所示的CDR1,SEQ ID NO:8所示的CDR2,SEQ ID NO:10所示的CDR3;轻链可变区各互补决定区的氨基酸序列为:SEQ ID NO:12所示的CDR1,CDR2序列为KVS(K、V、S分别代表赖氨酸、缬氨酸、丝氨酸),SEQ ID NO:14所示的CDR3。优选地,该重组抗人IgE抗体的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:16,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:18。

[0015] 本发明提供的第二种重组抗人IgE抗体,其重链可变区各互补决定区的氨基酸序列为:SEQ ID NO:5所示的CDR1,SEQ ID NO:7所示的CDR2,SEQ ID NO:9所示的CDR3;轻链可变区各互补决定区的氨基酸序列为:SEQ ID NO:11所示的CDR1,CDR2序列为RAS(R、A、S分别代表精氨酸、丙氨酸、丝氨酸),SEQ ID NO:13所示的CDR3。优选地,该重组抗人IgE抗体的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:15,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:17。

[0016] 本发明提供的一种化学发光法人IgE抗体检测试剂盒,包括抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂、标准品和质控品,其中抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂使用上述第一种重组抗人IgE抗体,生物素标记的抗人IgE抗体试剂使用上述第二种重组抗人IgE抗体。

[0017] 优选地,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中抗人IgE抗体包被的磁性微球的浓度为0.5～1.2mg/mL,所述生物素标记的抗人IgE抗体试剂中生物素标记的抗人IgE抗体浓度为0.05～0.2μg/mL,所述吖啶酯标记的链霉亲和素试剂中吖啶酯标记的链霉亲和素浓度为0.05～0.25μg/mL,所述标准品经过冷冻干燥,其复溶后包括6支不同浓度的人IgE蛋白

溶液:0IU/mL、0.45IU/mL、0.76IU/mL、3.6IU/mL、20.8IU/mL、94.8IU/mL,所述质控品经过冷冻干燥,其复溶后包括2支不同浓度的人IgE蛋白溶液:1.0IU/mL、20.0IU/mL。

[0018] 优选地,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂还包括缓冲液、稳定剂、保护剂、防腐剂、螯合剂,所述生物素标记的抗人IgE抗体试剂还包括缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂,所述吖啶酯标记的链霉亲和素试剂还包括缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂,所述复溶后标准品溶液还包括缓冲液、保护剂,所述复溶后质控品溶液还包括缓冲液、保护剂。

[0019] 在具体的实施例中,将抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中还包括的上述试剂称为磁性微球保存缓冲液,将生物素标记的抗人IgE抗体试剂中还包括的上述试剂称为生物素标记物保存缓冲液,将吖啶酯标记的链霉亲和素试剂中还包括的上述试剂称为吖啶酯标记物保存缓冲液,将复溶后的标准品溶液中还包括的上述试剂称为标准品稀释缓冲液,将复溶后的质控品溶液中还包括的上述试剂称为质控品稀释缓冲液。

[0020] 优选地,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,稳定剂为10～100g/L的蔗糖、海藻糖或葡萄糖,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,螯合剂为0.1～0.6g/L的EDTA;所述生物素标记的抗人IgE抗体试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,稳定剂为5～100g/L的蔗糖、葡萄糖或海藻糖,表面活性剂为0～2mL/L的Tritonx 100,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白;所述吖啶酯标记的链霉亲和素试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin300,稳定剂为10～100g/L的蔗糖、葡萄糖或海藻糖,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白;所述复溶后的标准品中:缓冲液为pH6.0～7.5乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,保护剂为1～10g/L的人血清白蛋白或牛血清白蛋白或0.05～0.1L/L的山羊血清;所述复溶后的质控品中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,保护剂为1～10g/L的人血清白蛋白或牛血清白蛋白或0.05～0.1L/L的山羊血清。

[0021] 优选地,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中磁性微球为羧基磁性微球或甲苯磺氨基磁性微球(粒径:1.5μm～3.0μm)。

[0022] 优选地,所述抗人IgE抗体包被的磁性微球的制备过程为:

[0023] 用0.02M乙磺酸缓冲液(pH5.0)将第一种重组抗人IgE抗体稀释至0.04mg/mL,制备成重组抗人IgE抗体稀释液;用0.02M乙磺酸缓冲液(pH5.0)将羧基磁性微球稀释至1mg/mL,再加入0.5%(质量浓度)的碳二亚胺(EDC),在25℃下振荡反应30min,反应结束后通过磁分离器去除未反应的EDC;然后加入1%(质量浓度)的上述重组抗人IgE抗体稀释液,在30℃下振荡反应30min,反应结束后通过磁分离器去除未反应的抗体,再加入由缓冲液、防腐剂、稳定剂、表面活性剂(如吐温20、曲拉通100等)组成的终止反应液终止反应,在37℃下振荡反应120min,反应结束后通过磁分离器收集磁性微球;最后加入包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、螯合剂的磁性微球保存缓冲液混匀,调整磁性微球质量浓度为0.5～1.2mg/mL;

[0024] 所述生物素标记的抗人IgE抗体的制备过程为:

[0025] 将第二种重组抗人IgE抗体以1:28摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,37℃条件下振荡反应30min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂的生物

素标记物保存缓冲液,调整其浓度到0.05～0.2μg/mL;

[0026] 所述吖啶酯标记的链霉亲和素的制备过程为:

[0027] 将链霉亲和素以1:5摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的吖啶酯中,37℃条件下振荡反应30min,反应后的溶液用硫酸铵盐析法纯化,将沉淀反应液离心,取沉淀物,用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)重悬沉淀物(即吖啶酯标记的链霉亲和素),BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂的吖啶酯标记物保存缓冲液,调整其浓度到0.05～0.25μg/mL。

[0028] 本发明还涉及化学发光法人IgE抗体检测试剂盒定量检测人IgE抗体的方法,包括以下步骤:

[0029] (1)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球、生物素标记的抗人IgE抗体与复溶后的标准品或者质控品或者检测样本,振荡混匀后,置于37℃反应20min,得到第一溶液,在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除第一溶液中未反应的生物素标记的抗人IgE抗体,得到第二溶液,形成抗人IgE抗体1-IgE-抗人IgE抗体2的双抗体夹心结构;

[0030] (2)向上述第二溶液中加入一定体积吖啶酯标记的链霉亲和素,振荡混匀后,置于37℃反应20min,得到第三溶液;在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除第三溶液中未反应的吖啶酯标记的链霉亲和素和杂质,得到第四溶液;

[0031] (3)向上述第四溶液中加入化学发光底物,测定发光强度;

[0032] (4)根据标准品标示浓度和标准品发光强度绘制标准曲线;

[0033] (5)根据步骤(4)所得标准曲线将质控品或检测样本的发光值换算成相应的浓度。

[0034] 本发明中,只要是适用于吖啶酯发光体系的化学发光底物液均可使用,如碱性过氧化氢溶液等。

[0035] 本发明还涉及化学发光法人IgE抗体检测试剂盒在全自动化学发光免疫分析仪上的应用,包括以下步骤:

[0036] (1)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或者通过仪器配套软件设定;

[0037] (2)将所述复溶后的标准品放入仪器全自动化学发光免疫分析仪样本仓,仪器自动识别或者通过仪器配套软件编辑对应检测信息,仪器识别标准品信息;

[0038] (3)将所述复溶后的质控品或其他待测样本放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,仪器自动识别或者通过仪器配套软件编辑对应检测信息,仪器识别质控品或待测样本信息;

[0039] (4)启动运行程序,仪器自动执行检测样本的检测,并根据标准品的发光值和标示浓度自动绘制标准曲线,利用标准曲线自动检测计算质控品或检测样本的浓度。

[0040] 本发明还提供一种化学发光法过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒,与上述化学发光法人IgE抗体检测试剂盒相比,本过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒还包括生物素标记的过敏原溶液试剂,其余试剂及制备工艺参见前述。

[0041] 优选地,所述过敏原为户尘螨、粉尘螨、艾蒿、黄花蒿过敏原。

[0042] 优选地,所述生物素标记的过敏原溶液试剂中过敏原溶液的浓度为0.025μg/mL～0.2μg/mL。

[0043] 优选地,所述生物素标记的户尘螨过敏原溶液试剂中包含等质量比混合的重组户尘螨主要过敏原蛋白Der p 1和Der p 2;所述生物素标记的粉尘螨过敏原溶液试剂中包含等质量比混合的重组粉尘螨主要过敏原蛋白Der f 1和Der f 2;所述生物素标记的艾蒿过敏原溶液试剂中包含等质量比混合的重组艾蒿主要过敏原蛋白Art v 1和Art v 3,所述生物素标记的黄花蒿过敏原溶液试剂中包含等质量比混合的重组黄花蒿主要过敏原蛋白Art a 1和Art a 3。

[0044] 优选地,所述生物素标记的过敏原溶液试剂中还包括缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂。

[0045] 在具体的实施例中,将生物素标记的过敏原溶液试剂中还包括的上述试剂称为生物素标记物保存缓冲液,其组成与上述生物素标记的抗人IgE抗体试剂的生物素标记物保存缓冲液相同。

[0046] 优选地,所述生物素标记的过敏原溶液试剂中:缓冲液为pH6.0～7.5的乙磺酸缓冲液或磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003～0.2L/L的Proclin 300,稳定剂为5～100g/L的蔗糖、葡萄糖或海藻糖,表面活性剂为0～2mL/L的Tritonx 100,保护剂为5～40g/L牛血清白蛋白。

[0047] 优选地,所述生物素标记的过敏原按以下方法制备:将重组过敏原蛋白以1:15～33摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,25～37℃条件下振荡反应,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液透析,BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂的生物素标记物保存缓冲液调整其浓度到0.025μg/mL～0.2μg/mL。

[0048] 本发明还提供了化学发光法过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒定量检测过敏原特异性IgE抗体的方法,包括以下步骤:

[0049] (1)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球、生物素标记的抗人IgE抗体与复溶后的标准品或者质控品,振荡混匀后,置于37℃反应20min,得到第一溶液,在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除第一溶液中未反应的生物素标记的抗人IgE抗体,得到第二溶液,形成抗人IgE抗体1-IgE-抗人IgE抗体2的双抗体夹心结构;

[0050] (2)向上述第二溶液中加入一定体积吖啶酯标记的链霉亲和素,振荡混匀后,置于37℃反应20min,得到第三溶液;在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除第三溶液中未反应的吖啶酯标记的链霉亲和素和杂质,得到第四溶液;

[0051] (3)向上述第四溶液中加入化学发光底物,测定标准品及质控品的发光强度;

[0052] (4)根据标准品标示浓度和标准品发光强度绘制标准曲线;

[0053] (5)根据步骤(4)所得标准曲线将质控品的发光值换算成相应的浓度,获得质控结果;

[0054] (6)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球、生物素标记的过敏原溶液、检测样本,振荡混匀后,置于37℃反应20min,在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除中未反应的生物素标记的过敏原;

[0055] (7)向步骤(6)所得溶液中加入一定体积的所述吖啶酯标记的链霉亲和素,振荡混匀后,置于37℃反应20min,形成抗人IgE抗体-过敏原特异性IgE-过敏原的复合物;在外加磁场作用下,磁分离洗涤去除未反应的吖啶酯标记的链霉亲和素和杂质;

[0056] (8)向步骤(7)所得溶液中加入化学发光底物,测定检测样本的发光强度;

[0057] (9)根据标准曲线将检测样本发光值换算成相应的浓度,获得检测样本中过敏原特异性IgE抗体的浓度。

[0058] 优选地,本发明过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒用于全自动化学发光免疫分析仪进行过敏原特异性IgE抗体的检测,包括以下步骤:

[0059] (1)将所述抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或者通过仪器配套软件设定;

[0060] (2)将所述标准品、质控品放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,仪器自动识别或通过仪器配套软件编辑对应检测信息,按照程序自动检测,形成校准曲线和质控结果;

[0061] (3)将生物素标记的过敏原溶液放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或通过仪器配套软件设定;

[0062] (4)将检测样本放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,通过仪器配套软件编辑对应检测信息,仪器识别待测样本信息后,按照程序自动检测,并根据校准曲线计算样品中过敏原特异性IgE浓度。

[0063] 本发明相比现有技术具有以下优势:

[0064] 本发明的重组抗人IgE抗体用于人IgE抗体检测,能够很好地识别和匹配人IgE蛋白表位,抗干扰能力强,均一性佳,组合使用不仅提高了检测性能,而且更具质量可控性,有利于人IgE抗体检测以及人IgE抗体检测试剂盒的制备。

[0065] 本发明基于磁性微球化学发光法的人IgE抗体检测方法及人IgE抗体检测试剂盒,采用特定的重组抗人IgE抗体包被磁性微球以及采用生物素标记特定的重组抗人IgE抗体,能够更好地匹配人IgE蛋白表位,抗干扰能力强且均一性佳,提高了试剂盒的检测性能和质控属性,具有很好的精密度、线性范围和准确度,操作简单,检测耗时短,且具有很强的通用性,适用于各种过敏原特异性IgE抗体的定量检测,临床实用性高,其配合过敏原溶液制备的过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒在准确度、精密度、线性以及特异性方面表现优越,检测结果稳定可靠,与临床过敏原特异性IgE检测“金标准”ImmunoCAP系统具有很好的一致性,还可应用于全自动化学发光检测仪器,具有很好的临床应用前景。

[0066] 本发明还优化了试剂盒的组成体系,进一步提高了人IgE抗体检测试剂盒的检测性能和稳定性。

[0067] 说明书附图

[0068] 图1:抗人IgE杂交瘤细胞基因PCR扩增结果。其中,图1(a)是pUC57-IgE10-LC及pUC57-IgE22-LC的PCR结果,泳道1为DNA marker,泳道2为pUC57-IgE10-LC,泳道3为pUC57-IgE22-LC;图1(b)是pUC57-IgE10-HC及pUC57-IgE22-HC的PCR结果,泳道1为DNAmarker,泳道2为pUC57-IgE10-HC,泳道3为pUC57-IgE22-HC。

[0069] 图2:纯化后的嵌合抗体进行还原性SDS-PAGE凝胶电泳的分析结果。其中,泳道1为蛋白marker;泳道2为本发明第二种重组抗人IgE抗体(来自抗人IgE杂交瘤细胞株E10的嵌合抗体);泳道3为本发明第一种重组抗人IgE抗体(来自抗人IgE杂交瘤细胞株E22的嵌合抗体)。

[0070] 图3:对照试剂盒1、对照试剂盒2、本发明人IgE抗体检测试剂盒的人IgE标准品检测结果。

图4:本发明过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒户尘螨特异性IgE检测结果与Thermo Fisher ImmunoCap系统户尘螨d1过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性评价。

[0071] 图5:本发明过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒粉尘螨特异性IgE抗体检测结果与Thermo Fisher ImmunoCap系统粉尘螨d2过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性评价。

[0072] 图6:本发明过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒艾蒿特异性IgE抗体检测结果与Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性评价。

[0073] 图7:本发明过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒黄花蒿特异性IgE抗体检测结果与Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性评价。

具体实施方式

[0074] 除非在本文中明确定义,否则本文使用的技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0075] 抗体又称免疫球蛋白,是一类由B淋巴细胞分泌的大型Y形蛋白质,能够特异性结合靶抗原的免疫球蛋白分子,所述靶抗原如蛋白质、糖、多核苷酸、脂、多肽、小分子化合物等。天然存在的IgG抗体是四聚体,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重链和两条轻链。每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL可以进一步细分为具有高变性的互补决定区(CDR,又称高变区),以及更保守的框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0076] 嵌合抗体,由鼠源抗体的可变区和人抗体的恒区融合而成。

[0077] 下面结合具体的实施例,进一步阐述本发明,应理解,实施例仅用于说明本发明的技术方案而不用于限制本发明的范围。

[0078] 实施例1:重组抗人IgE抗体的制备

[0079] (1)制备抗人IgE杂交瘤细胞株

[0080] 以重组人IgE蛋白(江苏众红生物工程创药研究院有限公司制备)按照一般免疫程序免疫BALB/c雌性小鼠(购自常州卡文斯实验动物有限公司),具体免疫情况参见《抗体制备与使用实验指南》。

[0081] 取上述免疫小鼠脾脏与小鼠骨髓瘤细胞经聚乙二醇诱导融合,经过选择性培养基及间接法ELISA的选择筛选流程,筛选出可稳定分泌抗人IgE抗体的杂交瘤细胞株。

[0082] 杂交瘤细胞株E10及E22显示高效价,后续进一步对该杂交瘤细胞株进行抗体可变区序列测序分析。

[0083] (2)测定抗人IgE杂交瘤细胞株抗体可变区序列

[0084] 将抗人IgE杂交瘤细胞株E10及E22培养至一定密度后收集细胞,使用High Pure RNA Isolation Kit(Roche)进行Total RNA提取。

[0085] 然后以抗人IgE的Total RNA为模板,使用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo)逆转录扩增其cDNA第一链。

[0086] 以抗人IgE杂交瘤细胞cDNA第一链为模板,加入上下游引物、dNTP、$MgCl_2$、Taq等原料,进行PCR扩增。

[0087] (3)重链及轻链可变区基因克隆和序列测定

[0088] 按照pGM-T Fast连接试剂盒说明书(北京天跟生化科技有限公司,VT207-02),将重、轻链可变区基因分别与pGM-T载体连接,转化大肠杆菌Top10感受态细胞中,蓝白斑筛选,37℃培养12-16h。将得到的白色菌落接种含有终浓度为100μL的氨苄青霉素1-5mL LB培养基中,37℃摇床振荡3-4h后,PCR筛选插入正确序列克隆。同时将PCR筛选阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序,测定结果通过计算机网络基因库Kabat、Chothia及IMGT比较分析,获得抗体的E10和E22的重链可变区基因(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)和轻链可变区基因(SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)。

[0089] 经数据库分析上述序列,重链可变区各互补决定区的氨基酸序列分别是:序列SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的CDR1,序列SEQ ID NO:7和序列SEQ ID NO:8所示的CDR2,序列SEQ ID NO:9和序列SEQ ID NO:10所示的CDR3;轻链可变区各互补决定区的氨基酸序列分别是:序列SEQ ID NO:11和序列SEQ ID NO:12所示的CDR1,序列CDR2分别为RAS、KVS,序列SEQ ID NO:13和序列SEQ ID NO:14所示的CDR3。

[0090] (4)抗人IgE嵌合抗体表达

[0091] 将上述步骤(3)中抗人IgE杂交瘤细胞E10和E22重链可变区序列分别直接与人单抗IgG1重链恒定区融合,获得抗人IgE嵌合抗体重链氨基酸序列(SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16),将抗人IgE杂交瘤细胞E10和E22轻链可变区序列分别直接与人抗体轻链恒定区融合,获得抗人IgE嵌合抗体轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18),并分别将抗人IgE杂交瘤细胞重链和轻链基因分别用OptimumGene™密码子优化软件进行密码子优化后得到本发明的抗人IgE杂交瘤细胞E10和E22的抗体重链基因(SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20)和轻链基因(SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22)。

[0092] 将优化后的抗人IgE杂交瘤细胞重链基因在5'端引入AvrII酶切位点序列,在3'端引入BstZ7I酶切位点序列,并进行全基因合成,将合成的基因片段,构建到pUC57质粒(由南京金斯瑞科技有限公司提供)中,得到一种长期保存质粒,记为pUC57-IgE10-HC、pUC57-IgE22-HC质粒。将优化后的抗人IgE杂交瘤细胞轻链基因在5'端引入EcoRV酶切位点序列,在3'端引入PacI酶切位点序列,并进行全基因合成,将合成的基因片段,构建到pUC57质粒中,得到一种长期保存质粒,记为pUC57-IgE10-LC、pUC57-IgE10-LC质粒。

[0093] 分别以pUC57-IgE10-HC、pUC57-IgE22-HC和pUC57-IgE10-LC、pUC57-IgE22-LC质粒为模板,进行PCR扩增,所用引物序列如下:

[0094] 上游引物M13 F:CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC

[0095] 下游引物M13 R:AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA

[0096] 反应总体积50μL,其中浓度为10μmol/L引物各加2.5μL,浓度为10mmol/L的dNTP加1μL,所用DNA聚合酶为Q5,2U/μL,加0.5μL。反应条件为98℃5秒、55℃45秒、72℃30秒,25个循环后,产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示产物大小与预期大小一致(图1)。

[0097] 用AvrII(#R0174S,购自New England BioLabs公司)和BstZ17I(#R0594S,购自New England BioLabs公司)双酶切后,1%琼脂糖电泳,得到的重链基因产物用DNA凝胶回收试剂盒(DP214,购自北京天根生化科技有限公司)纯化。用T4连接酶(#M0202S,购自New England BioLabs)连接到pCHO1.0质粒(购自Life公司)中,转化到Top10感受态细胞(CB104,购自北京天根生化科技有限公司)中,在含有卡那霉素(0408,购自Amresco公司)的

LB固体培养基中37℃培养过夜。第二天挑取阳性克隆菌进行PCR鉴定,并将阳性结果进行测序比对,与预期序列完全一致,即得到重链表达质粒,记为pCHO1.0-E10HC和pCHO1.0-E22HC。

[0098] 用EcoRV(#R3195S,购自New England BioLabs公司)和PacI(#R0547S,购自New England BioLabs公司)双酶切后,1%琼脂糖电泳,得到的轻链基因产物用DNA凝胶回收试剂盒纯化。用T4连接酶分别连接到pCHO1.0-E10HC和pCHO1.0-E22HC质粒中,转化到Top10感受态细胞中,在含有卡那霉素的LB固体培养基中37℃培养过夜。第二天挑取阳性克隆菌进行PCR鉴定,并将阳性结果进行测序比对,与预期序列完全一致,即得到嵌合单抗的表达质粒,记为pCHO1.0-E10和pCHO1.0-E22。

[0099] 将测序正确的pCHO1.0-E10和pCHO1.0-E22质粒用NruI限制内切酶线性化,电转染到CHO-S宿主细胞中后,分别加入一定浓度的Puromycin和MTX置于二氧化碳培养箱中37℃,8%CO_2进行加压筛选。10天后计算细胞活率,当细胞活率大于30%以上转移到摇床中,37℃,8%CO_2,130rpm悬浮培养,获得稳定表达抗人IgE嵌合抗体细胞株。

[0100] 将稳定表达抗人IgE嵌合抗体细胞株接种于Dynamis培养基中,37℃,8%CO_2,130rpm摇床中培养。当细胞密度达到5×10^6cells/mL后,加入葡萄糖和补料培养基至摇瓶中。每天取样计算细胞密度,并每隔一天加入葡萄糖和补料培养基至摇瓶中,直至细胞活力低于85%收集上清培养液。将上述上清培养液,12000rpm,15min低温离心收集上清,0.22μm滤膜过滤即得处理后培养液上清,可进行层析纯化。

[0101] 亲和层析选用的层析柱是HiTrap MabSelect SuRe(11-0034-94,购自GE healthcare),利用Mabselect SuRe亲和层析柱从表达上清中捕获所有带Fc结构域的抗体,用平衡缓冲液(20mM NaH_2PO_4,150mM NaCl,pH7.2)平衡层析柱后,过亲和层析柱,用洗脱缓冲液(100mM柠檬酸,pH3.0)洗脱。通过HiTrap Capto S(17-5441-22,购自GE healthcare)阳离子交换层析,实现目标抗体精纯和换液,用平衡缓冲液A(50mM NaH_2PO_4,pH 5.0)平衡层析柱后,样品用双蒸水稀释电导至3.0-3.5ms之间,过HiTrap Capto S柱子结合后,用洗脱缓冲液B(50mM NaH_2PO_4,1M NaCl,pH 6.0)线性洗脱。纯化后的嵌合抗体进行还原性SDS-PAGE凝胶电泳分析,纯度在95%以上(图2),其中来自抗人IgE杂交瘤细胞株E22的重组抗人IgE抗体为本发明第一种重组抗人IgE抗体,来自抗人IgE杂交瘤细胞株E10的重组抗人IgE抗体为本发明第二种重组抗人IgE抗体。

[0102] 实施例2:人IgE抗体检测试剂盒的制备

[0103] 本实施例用于说明本发明人IgE抗体检测试剂盒的制备过程,所有条件和参数仅作为举例说明,不作为本发明的限定。

[0104] (1)制备抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂

[0105] 本发明试剂盒使用羧基磁性微球或甲苯磺氨基磁性微球(粒径:1.5μm~3.0μm),本实施例以羧基磁性微球(购自日本JSR公司,粒径:3.0μm)为例说明制备过程。

[0106] 用0.02M乙磺酸缓冲液(pH5.0)将第一种重组抗人IgE抗体稀释至0.04mg/mL,制备成重组抗人IgE抗体稀释液。用0.02M乙磺酸缓冲液(pH5.0)将羧基磁性微球稀释至1mg/mL,再加入0.5%(质量浓度)的碳二亚胺(EDC),在25℃下振荡反应30min,反应结束后通过磁分离器去除未反应的EDC。然后加入1%(质量浓度)的上述重组抗人IgE抗体稀释液,在30℃下振荡反应30min,反应结束后通过磁分离器去除未反应的抗体。再加入包含缓冲液、防腐剂、

稳定剂、表面活性剂(如吐温20,曲拉通100等)的终止反应液终止反应,在37℃下振荡反应120min,反应结束后通过磁分离器收集磁性微球。最后加入包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、螯合剂的磁性微球保存缓冲液混匀,调整磁性微球质量浓度为0.75mg/mL。

[0107] (2)制备生物素标记的抗人IgE试剂

[0108] 将第二种重组抗人IgE抗体以1:28摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,37℃条件下振荡反应30min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂、表面活性剂的生物素标记物保存缓冲液,调整其浓度到0.04μg/mL。

[0109] (3)制备吖啶酯标记的链霉亲和素试剂

[0110] 将链霉亲和素以1:5摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的吖啶酯中,37℃条件下振荡反应30min,反应后的溶液用硫酸铵盐析法纯化,将沉淀反应液离心,取沉淀物,用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)重悬沉淀物(即吖啶酯标记的链霉亲和素),BCA法测定标记物的浓度,并用包含缓冲液、防腐剂、稳定剂、保护剂的吖啶酯标记物保存缓冲液,调整其浓度到0.05μg/mL。

[0111] (4)制备标准品冻干剂型

[0112] 取人IgE蛋白,用标准品稀释缓冲液配制成0IU/mL、0.45IU/mL、0.76IU/mL、3.6IU/mL、20.8IU/mL、94.8IU/mL的标准品冻干液。在洁净的中硼硅玻璃管制注射剂瓶中分装一定体积的标准品冻干液,按照预设在冻干机的工艺曲线(表1)进行冷冻干燥,冻干后的标准品压上橡胶塞,加上铝盖。

[0113] (5)制备质控品冻干剂型

[0114] 取人IgE蛋白,用质控品稀释缓冲液配制成1.0IU/mL、20.0IU/mL的质控品冻干液。在洁净的中硼硅玻璃管制注射剂瓶中分装一定体积的质控品冻干液,按照预设在冻干机的工艺曲线(表1)进行冷冻干燥,冻干后的质控品压上橡胶塞,加上铝盖。

[0115] 冻干剂型标准品和质控品的冻干工艺曲线

[0116]

设定温度/℃	设定时间/min	持续时间/min	控制真空/mbar
制冷阶段			
-12	20	60	/
-45	20	600	/
一次干燥			
-15	360	900	0.18
解析干燥			
25	300	520	0.18

[0117] 实施例3:人IgE抗体检测试剂盒在全自动化学发光免疫分析仪上的应用

[0118] 本发明人IgE抗体检测试剂盒可用于各种品牌的全自动化学发光免疫分析仪(适用于直接化学发光体系),具体的操作步骤根据各仪器使用要求的不同略有差异。本实施例以重庆科斯迈生产的SMART 500S、SMART 6500S系列全自动化学发光免疫分析仪为例说明操作步骤。

[0119] (1)将本发明人IgE抗体检测试剂盒中的抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物

素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或者通过仪器配套软件设定;

[0120] (2)将本发明冻干的标准品加入一定体积纯化水复溶后,放入仪器全自动化学发光免疫分析仪样本仓,通过仪器配套软件编辑对应检测信息,或者通过扫描条形码,仪器识别标准品信息;

[0121] (3)将本发明冻干的质控品加入一定体积纯化水复溶或其他检测样本放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,通过仪器配套软件编辑对应检测信息,或者通过扫描条形码,仪器识别质控品或待测样本信息;

[0122] (4)启动运行程序,仪器自动处理标准品绘制标准曲线,并利用标准曲线自动检测计算质控品或检测样本的浓度。

[0123] 实施例4:人IgE抗体检测试剂盒性能评价

[0124] 本申请制备了对照试剂盒与本发明人IgE抗体检测试剂盒进行性能比较,对照试剂盒与本发明人IgE抗体检测试剂盒的不同之处在于,包被磁性微球的重组抗人IgE抗体和生物素标记的重组抗人IgE抗体被替换为其他商品化抗人IgE抗体或其他自制抗人IgE抗体,其余制备方法与本发明相同。相较于各对照试剂盒,本发明人IgE抗体检测试剂盒在线性范围、精密度、准确度方面优势明显。

[0125] 本实施例以商品化抗人IgE抗体包被磁性微球制备对照试剂盒1、生物素标记商品化重组抗人IgE蛋白制备对照试剂盒2为例,与本发明人IgE抗体检测试剂盒进行性能比较,说明本发明的优势。本实施例中的所有条件和参数仅作为举例说明,不作为本发明的限定。

[0126] 本发明人IgE抗体检测试剂盒:抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂中磁性微球的浓度为0.75mg/mL,缓冲液为pH7.0的磷酸盐缓冲液,稳定剂为10g/L的蔗糖,保护剂为20g/L牛血清白蛋白,防腐剂为0.003L/L的Proclin 300,螯合剂为0.3g/L的EDTA;生物素标记的抗人IgE抗体试剂中生物素标记的抗人IgE抗体浓度为0.05μg/mL,缓冲液为pH7.0的磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003L/L的Proclin 300,稳定剂为20g/L的蔗糖,表面活性剂为0.5mL/L的Tritonx100,保护剂为20g/L牛血清白蛋白;吖啶酯标记的链霉亲和素试剂中吖啶酯标记的链霉亲和素浓度为0.05μg/mL,缓冲液为pH7.0的磷酸盐缓冲液,防腐剂为0.003L/L的Proclin 300,稳定剂为10g/L的蔗糖,保护剂为20g/L牛血清白蛋白;标准品经复溶后包括6支不同浓度的人IgE蛋白溶液:0IU/mL、0.45IU/mL、0.76IU/mL、3.6IU/mL、20.8IU/mL、94.8IU/mL,缓冲液为pH7.0磷酸盐缓冲液,保护剂为0.05L/L的山羊血清;所述质控品经复溶后包括2支不同浓度的人IgE蛋白溶液:1.0IU/mL、20.0IU/mL,缓冲液为pH7.0磷酸盐缓冲液,保护剂为0.05L/L的山羊血清(实施例5的制备例3)。

[0127] 对照试剂盒1:用商品化鼠抗人IgE单克隆抗体(厂家:南京金斯瑞生物科技有限公司,货号:V05301)替换本发明第一种重组抗人IgE抗体制备抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂,其余同上述本发明人IgE抗体检测试剂盒。

[0128] 对照试剂盒2:用商品化重组抗人IgE蛋白(厂家:北京义翘神州股份有限公司,货号:68043-H001)替换本发明第二种重组抗人IgE抗体制备生物素标记的抗人IgE抗体试剂,其余同上述本发明人IgE抗体检测试剂盒。

[0129] (1)线性范围

[0130] 在相同检测条件下,用本发明人IgE抗体检测试剂盒、对照试剂盒1和对照试剂盒2

对6个不同浓度的人IgE标准品(0IU/mL、0.45IU/mL、0.76IU/mL、3.6IU/mL、20.8IU/mL、94.8IU/mL)进行测试,评价线性指标。

[0131] 根据标准曲线的比较结果可知,本发明人IgE抗体检测试剂盒的检测灵敏度显著高于对照试剂盒1,检测范围显著宽于对照试剂盒2(图3)。

[0132] 上述线性指标的检测结果表明,本发明试剂盒具有良好的检测灵敏度和线性范围,完全满足行业标准《YY/T1581-2018过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒》所规定的线性区间:0.35IU/mL～100IU/mL。检测灵敏度高有利于低浓度样本的准确度检测,确保检测结果的稳定性,检测范围宽有利于较高浓度样本的直接检测,不需要再另行稀释,减少稀释操作误差,确保检测准确度。上述结果也表明,本发明第一重组抗人IgE抗体和第二重组抗人IgE抗体较其他商品化抗人IgE抗体,能够更好地识别和匹配人IgE蛋白表位,组合使用对人IgE抗体检测更具优势,更利于人IgE抗体检测以及人IgE抗体检测试剂盒的制备。

[0133] (2)精密度

[0134] 在相同的检测条件下,分别用3批次的上述本发明人IgE抗体检测试剂盒、对照试剂盒1和对照试剂盒2检测相同的人血清样本,根据公式(1)计算批内变异系数(CV)和批间变异系数(CV),比较三种试剂盒的批内精密度和批间精密度。

[0135] $$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad \cdots\cdots (1)$$

[0136] 批内精密度:用各批次的本发明人IgE抗体检测试剂盒、对照试剂盒1和对照试剂盒2分别检测高低两种浓度的人血清样本(0.45IU/mL,10.2IU/mL),重复测试10次,分别计算三种试剂盒批次内的10次测量浓度值的平均值$\bar{x}$和标准差异SD,根据公式(1)计算批内变异系数(CV)。

[0137] 批间精密度:用各批次的本发明人IgE抗体检测试剂盒、对照试剂盒1和对照试剂盒2分别检测高低两种浓度的人血清样本(0.45IU/mL,10.2IU/mL),各重复测试10次,分别计算三种试剂盒3批次共30次测量浓度值的平均值$\bar{x}$和标准差异SD,根据公式(1)计算批间变异系数(CV)。

[0138] 批内CV和批间CV的结果(表1、表2)表明,本发明人IgE抗体检测试剂盒相较于对照试剂盒,批内和批间检测结果的变异和误差更小,具有更好的精密度。上述结果也表明,本发明第一重组抗人IgE抗体和第二重组抗人IgE抗体较其他商品化抗人IgE抗体,均一性更佳,更具质量可控性,组合使用对人IgE抗体检测更具优势,更利于人IgE抗体检测以及人IgE抗体检测试剂盒批内和批间差异的质量控制。

[0139] 表1人IgE抗体检测精密度评价(0.45IU/mL人血清样本)

[0140]

指标说明	本发明试剂盒			对照试剂盒 1			对照试剂盒 2		

[0141]

	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
批内 CV	3.29%	2.54%	3.33%	9.17%	9.03%	8.33%	12.13%	15.33%	13.39%
批间 CV	3.89%			6.87%			12.28%		

[0142] 表2人IgE抗体检测精密度评价(10.2IU/mL人血清样本)

[0143]

指标说明	本发明试剂盒			对照试剂盒 1			对照试剂盒 2		
	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
批内 CV	1.95%	1.91%	1.86%	6.54%	5.68%	5.31%	10.02%	8.37%	9.64%
批间 CV	2.61%			5.55%			10.04%		

[0144] 3、准确度

[0145] 在相同检测条件下,分别用3批次的上述本发明人IgE抗体检测试剂盒、对照试剂盒1和对照试剂盒2检测2个已知浓度(T)的人IgE质控品(1.0IU/mL,20.0IU/mL),各重复测试3次,计算3次检测结果的平均值$\bar{x}$,根据公式(2)计算相对偏差(B),评价三种试剂盒的准确度指标。

[0146] $$B = \frac{(\bar{x}-T)}{T} \times 100\% \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

[0147] 根据相对偏差的结果(表3、表4)可知,本发明人IgE抗体检测试剂盒各批次的检测值与质控品靶值的相对偏差较小,相较于对照试剂盒更加接近质控品浓度,在准确度方面具有更好的优势,有利于临床检验实验室的质量控制。上述结果也表明,本发明第一重组抗人IgE抗体和第二重组抗人IgE抗体较其他商品化抗人IgE抗体抗干扰能力更强,能够更好地识别和匹配人IgE蛋白表位,组合使用对人IgE抗体检测更具优势,更利于人IgE抗体检测以及IgE抗体检测试剂盒的制备。

[0148] 表3人IgE抗体检测准确度评价(1.0IU/mL人IgE质控品)

[0149]

指标说明	本发明试剂盒			对照试剂盒 1			对照试剂盒 2		
	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
相对偏差	1.01%	1.26%	2.12%	10.00%	12.12%	6.72%	4.38%	-4.46%	7.22%

[0150] 表4人IgE抗体检测准确度评价(20.0IU/mL人IgE质控品)

[0151]

指标说明	本发明试剂盒			对照试剂盒 1			对照试剂盒 2		
	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
相对偏差	-0.05%	1.33%	2.54%	6.77%	3.54%	5.55%	2.06%	8.99%	3.32%

[0152] 实施例5:人IgE抗体检测试剂盒体系优化

[0153] 本实施例使用本发明重组抗人IgE抗体,以不同的组成体系制备抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂、标准品和质控品,评价和比对各试剂盒的准确度、线性,具体评价方法参考实施例4,结果显示,本发明人IgE抗体检测试剂盒经优化组成体系(如制备例1-5),相较于其他比较例试剂盒在准确度和线性方面表现更优。表5、表7仅用于展示本发明人IgE抗体检测试剂盒体系优化的过程和性能比较结果,不作为本发明的限定。

[0154] 表5不同试剂盒组成体系的比对结果(制备例1～5)

[0155]

试剂名	组成	制备例1	制备例2	制备例3	制备例4	制备例5
抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH7.2)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	稳定剂	蔗糖(100g/L)	蔗糖(50g/L)	蔗糖(10g/L)	海藻糖(50g/L)	葡萄糖(20g/L)
	保护剂	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(40g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)
	防腐剂	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.003L/L)	Proclin 300(0.2L/L)	Proclin 300(0.003L/L)
	螯合剂	EDTA(0.1 g/L)	EDTA(0.5 g/L)	EDTA(0.3 g/L)	EDTA(0.6g/L)	EDTA(0.3 g/L)
	磁性微球浓度	0.5mg/ml	1mg/ml	0.75mg/ml	0.6mg/ml	1.2mg/ml
吖啶酯标记的链霉亲和素试	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH7.2)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	防腐剂	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.003L/L)	Proclin 300(0.2L/L)	Proclin 300(0.003L/L)
	稳定剂	蔗糖(100g/L)	蔗糖(20g/L)	蔗糖(10g/L)	海藻糖(50g/L)	葡萄糖(20g/L)
	保护剂	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(40g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)
	吖啶酯标记的链霉亲和素浓度	0.1μg/ml	0.25μg/ml	0.05μg/ml	0.15μg/ml	0.1μg/ml
生物素标记的抗人IgE抗体试剂	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH7.2)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	防腐剂	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.003L/L)	Proclin 300(0.2L/L)	Proclin 300(0.003L/L)
	稳定剂	蔗糖(100g/L)	蔗糖(5g/L)	蔗糖(20g/L)	海藻糖(50g/L)	葡萄糖(20g/L)
	表面活性剂	Tritonx 100(0.1ml/L)	Tritonx 100(2ml/L)	Tritonx 100(0.5ml/L)	Tritonx 100(0ml/L)	Tritonx 100(0.5ml/L)
	保护剂	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(40g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)
	生物素标记的抗人IgE抗体浓度	0.15μg/ml	0.1μg/ml	0.05μg/ml	0.1μg/ml	0.2μg/ml
校准品/质控品	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH7.2)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	保护剂	人血清白蛋白(10g/L)	山羊血清(0.1L/L)	山羊血清(0.05L/L)	人血清白蛋白(1g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)
性能检测	准确度(相对偏差)	12.80%	5.27%	-1.02%	3.46%	-2.02%
	线性(IU/ml)	0.35~100.0	0.1~100.0	0.1~150.0	0.35~100.0	0.1~120.0

[0156] 表6不同试剂盒组成体系的比对结果(比较例1～4)

[0157]

试剂名	组成	比较例1	比较例2	比较例3	比较例4
抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	Tris缓冲液(0.05M，pH8.0)
	稳定剂	蔗糖(100g/L)	蔗糖(50g/L)	蔗糖(10g/L)	甘露醇(30g/L)
	保护剂	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(40g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)	酪蛋白(10g/L)
	防腐剂	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.003L/L)	Proclin 300(0.1L/L)
	螯合剂	EDTA(0.1 g/L)	EDTA(0.5 g/L)	EDTA(0.3 g/L)	EDTA(1 g/L)
	磁性微球浓度	0.3mg/ml	1mg/ml	0.75mg/ml	1mg/ml
吖啶酯标记的链霉亲和素试	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	Tris缓冲液(0.05M，pH8.0)
	防腐剂	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.003L/L)	Proclin 300(0.1L/L)
	稳定剂	蔗糖(100g/L)	蔗糖(20g/L)	蔗糖(10g/L)	甘露醇(30g/L)
	保护剂	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(40g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)	酪蛋白(10g/L)
	吖啶酯标记的链霉亲和素浓度	0.1μg/ml	0.03μg/ml	0.05μg/ml	0.1μg/ml
生物素标记的抗人IgE抗体试剂	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	Tris缓冲液(0.05M，pH8.0)
	防腐剂	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.003L/L)	Proclin 300(0.1L/L)
	稳定剂	蔗糖(100g/L)	蔗糖(5g/L)	蔗糖(20g/L)	甘露醇(30g/L)
	表面活性剂	Tritonx 100(0.1ml/L)	Tritonx 100(2ml/L)	Tritonx 100(0.5ml/L)	Tween 20(0.5ml/L)
	保护剂	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(40g/L)	牛血清白蛋白(20g/L)	酪蛋白(10g/L)
	生物素标记的抗人IgE抗体浓度	0.15μg/ml	0.1μg/ml	0.03μg/ml	1μg/ml
校准品/质控品	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.05M，pH7.5)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)	Tris缓冲液(0.05M，pH8.0)
	保护剂	人血清白蛋白(10g/L)	山羊血清(0.1L/L)	山羊血清(0.05L/L)	小牛血清(0.1L/L)
性能检测	准确度(相对偏差)	13.60%	6.25%	18.60%	30.97%
	线性(IU/ml)	3.5~50	7.5~50	3.5~50	0.05~50.0

[0158] 表7不同试剂盒组成体系的比对结果(比较例5～8)

[0159]

试剂名	组成	比较例5	比较例6	比较例7	比较例8
抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH5.0)	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH8.0)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	稳定剂	海藻糖(20g/L)	山梨醇(30g/L)	海藻糖(50g/L)	葡萄糖(20g/L)
	保护剂	明胶(20g/L)	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)	牛血清白蛋白(2g/L)
	防腐剂	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.2L/L)	Proclin 300(0.003L/L)
	螯合剂	EDTA(0.5 g/L)	EDTA(0.1 g/L)	EDTA(0.6g/L)	EDTA(0.3 g/L)
	磁性微球浓度	1mg/ml	0.6mg/ml	0.6mg/ml	1.2mg/ml
吖啶酯标记的链霉亲和素试	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH5.0)	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH8.0)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	防腐剂	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.2L/L)	Proclin 300(0.003L/L)
	稳定剂	海藻糖(20g/L)	山梨醇(30g/L)	海藻糖(50g/L)	葡萄糖(20g/L)
	保护剂	明胶(20g/L)	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)	牛血清白蛋白(2g/L)
	吖啶酯标记的链霉亲和素浓度	0.02μg/ml	0.15μg/ml	0.15μg/ml	0.1μg/ml
生物素标记的抗人IgE抗体试剂	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH5.0)	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH8.0)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	防腐剂	Proclin 300(0.01L/L)	Proclin 300(0.1L/L)	Proclin 300(0.2L/L)	Proclin 300(0.003L/L)
	稳定剂	海藻糖(20g/L)	山梨醇(30g/L)	海藻糖(50g/L)	葡萄糖(20g/L)
	表面活性剂	CHAPS(0.5ml/L)	Tritonx 100(0.1ml/L)	Tritonx 100(0ml/L)	Tritonx 100(0.5ml/L)
	保护剂	明胶(20g/L)	牛血清白蛋白(5g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)	牛血清白蛋白(2g/L)
	生物素标记的抗人IgE抗体浓度	0.03μg/ml	0.15μg/ml	0.1μg/ml	0.2μg/ml
校准品/质控品	缓冲液	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH5.0)	乙磺酸缓冲液(0.02M，pH6.0)	磷酸盐缓冲液(0.03M，pH8.0)	磷酸盐缓冲液(0.005M，pH7.0)
	保护剂	马血清(0.1L/L)	人血清白蛋白(10g/L)	人血清白蛋白(1g/L)	牛血清白蛋白(10g/L)
性能检测	准确度(相对偏差)	18.84%	15.80%	16.20%	-12.02%
	线性(IU/ml)	10.0~120.0	0.35~100.0	0.35~100.0	3.5~100.0

[0160] 实施例6:过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒制备及应用

[0161] 本发明人IgE抗体检测试剂盒具有良好的线性范围、精密度及准确度,实验证明其可配合生物素标记的过敏原溶液构成过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒,用于定量检测各种过敏原特异性IgE抗体,各过敏原溶液的浓度范围分别为0.025μg/ml～0.2μg/ml。本实施例制备了生物素标记的户尘螨、粉尘螨、艾蒿、黄花蒿过敏原溶液,用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合上述过敏原溶液,在重庆科斯迈生产的SMART 500S、SMART 6500S系列全自动化学发光免疫分析仪上,定量检测户尘螨、粉尘螨、艾蒿、黄花蒿特异性IgE抗体,以此为例说明本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的过敏原溶液构成过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的制备以及定量检测过敏原特异性IgE抗体的步骤,本实施例仅作为例举,不作为本发明的限制。

[0162] (1)制备生物素标记的重组过敏原溶液:

[0163] 生物素标记的户尘螨过敏原溶液:将重组户尘螨过敏原蛋白(Der p 1和Der p 2质量比为1:1的混合蛋白)以1:33摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,28℃条件下振荡反应15min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.005M,pH7.0～7.4)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用生物素标记物保存缓冲液调整其浓度到0.05μg/mL。

[0164] 生物素标记的粉尘螨过敏原溶液:将重组粉尘螨蛋白(Der f 1和Der f 2质量比为1:1的混合蛋白)以1:15摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,25℃条件下

振荡反应30min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.01M,pH8.0)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用生物素标记物保存缓冲液调整其浓度到0.13μg/mL。

[0165] 生物素标记的艾蒿过敏原溶液:将重组艾蒿蛋白(Art v 1和Art v 3质量比为1:1的混合蛋白)以1:20摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,37℃条件下振荡反应20min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.05M,pH6.5)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用生物素标记物保存缓冲液调整其浓度到0.2μg/mL。

[0166] 生物素标记的黄花蒿过敏原溶液:将重组黄花蒿蛋白(Art a 1和Art a 3质量比为1:1的混合蛋白)以1:20摩尔比的比例加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,37℃条件下振荡反应20min,反应后的溶液用磷酸盐缓冲液(0.05M,pH6.5)透析,BCA法测定标记物的浓度,并用生物素标记物保存缓冲液调整其浓度到0.08μg/mL。

[0167] (2)将本发明人IgE抗体检测试剂盒中的抗人IgE抗体包被的磁性微球试剂、生物素标记的抗人IgE抗体试剂、吖啶酯标记的链霉亲和素试剂放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或者通过仪器配套软件设定;

[0168] (3)向本发明人IgE抗体检测试剂盒中的冻干剂型标准品和冻干剂型质控品加入一定体积纯化水复溶,再放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,仪器自动识别或通过仪器配套软件编辑对应检测信息,按照程序自动检测,形成校准曲线和质控结果;

[0169] (4)将上述制备的生物素标记的过敏原溶液分别放入全自动化学发光免疫分析仪试剂仓的对应位置,仪器自动识别或通过仪器配套软件设定;

[0170] (5)将检测样本分别放入全自动化学发光免疫分析仪样本仓,通过仪器配套软件编辑对应检测信息,仪器识别待测样本信息后,按照程序自动检测,并根据校准曲线计算样品中过敏原特异性IgE浓度。

[0171] 作为本发明过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒性能评价的举例说明,以下实施例7~10以实施例4制备的本发明人IgE抗体检测试剂盒配合实施例6制备的生物素标记的过敏原溶液构成过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒,在重庆科斯迈生产的SMART 500S、SMART 6500S系列全自动化学发光免疫分析仪上,分别定量检测户尘螨、粉尘螨、艾蒿、黄花蒿特异性IgE抗体,检测方法参考实施例6,结果显示良好的准确度、精密度、线性以及特异性,并且与临床过敏原特异性IgE检测“金标准”ImmunoCap系统具有很好的一致性。

[0172] 本发明人IgE抗体检测试剂盒在线性范围、精密度及准确度方面表现优越,配合生物素标记的其他过敏原溶液定量检测特异性IgE抗体,也显示良好的检测性能以及稳定的检测结果,并与“金标准”ImmunoCap系统一致性良好,本实施例仅作为例举,不作为本发明的限制。

[0173] 实施例7:户尘螨特异性IgE抗体检测性能评价

[0174] (1)准确度

[0175] 分别选用2份户尘螨阳性血清样本(血清样本1:户尘螨特异性IgE抗体浓度在30IU/mL~70IU/mL,血清样本2:户尘螨特异性IgE抗体浓度在71IU/mL~350IU/mL)作为检测样本,加入到户尘螨弱阳性血清样本(户尘螨特异性抗体IgE在0.35IU/mL~0.75IU/mL)中,所加检测样本与弱阳性血清样本的体积比例为1:19,加入检测样本后的血清样本浓度应在检测范围内。用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液构成的户尘螨特异性IgE检测试剂盒,对每个样本重复检测3次,计算平均值(C),按公式(3)计

算回收率R。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液检测户尘螨特异性IgE抗体的回收率均在85%～115%之间(表8)。

[0176] $$R=\frac{C\times(V_0+V)-C_0\times V_0}{V\times C_S}\times 100\%\quad\text{……(3)}$$

[0177] R:回收率;

[0178] V:加入户尘螨阳性血清样本的体积;

[0179] V0:户尘螨弱阳性血清样本的体积;

[0180] C:待测物加入户尘螨弱阳性血清样本后的检测浓度;

[0181] C0:户尘螨弱阳性血清样本的检测浓度;

[0182] Cs:户尘螨阳性血清样本的浓度。

[0183] 表8户尘螨特异性IgE抗体检测准确度评价

[0184]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
回收率	90.5%/109.3%	93.1%/112.3%	91.7%/106.8%	105.3%/101.7%

[0185] (2)精密度

[0186] 用3批次的本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液构成的户尘螨特异性IgE检测试剂盒,在相同检测条件下分别检测相同的人血清样本的户尘螨特异性IgE抗体浓度,计算批内变异系数(CV)和批间变异系数(CV)。

[0187] 批内精密度:以户尘螨特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.7IU/mL及3.5IU/mL～17.5IU/mL的人血清样本作为检测样本,重复测试10次,分别计算批次内的测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4的公式(1)计算批内变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液检测户尘螨特异性IgE抗体的批内CV均小于10%(表9)。

[0188] 批间精密度:以户尘螨特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.7IU/mL及3.5IU/mL～17.5IU/mL的人血清样本为检测样本,重复测试10次,分别计算3批次30个测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批间变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液检测户尘螨特异性IgE抗体的批间CV小于20%(表9)。

[0189] 表9户尘螨特异性IgE抗体检测精密度评价

[0190]

指标说明	批次 1	批次 2	批次 3	注册检验批
批内 CV	7.80%/4.91%	4.10%/2.23%	5.85%/4.20%	0.73IU/mL：4.1% 8.18IU/mL：1.9%
批间 CV	10.70%/5.22%			0.73IU/mL：4.7% 8.18IU/mL：3.7%

[0191] (3)线性

[0192] 用标准品稀释缓冲液稀释接近线性范围上限(100IU/mL)的高浓度样本,混合成5个浓度在0.35IU/mL～100IU/mL范围的样本,对每个浓度的样本重复检测3次,计算每个稀释浓度的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以检测结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(4)计算线性回归的相关系数(r)。结果显示,r均大于0.9900(表10)。

[0193] $$r=\frac{\sum\left[(x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})\right]}{\sqrt{\sum(x_i-\bar{x})^2\sum(y_i-\bar{y})^2}} \quad \cdots\cdots(4)$$

[0194] 表10户尘螨特异性IgE抗体检测线性评价

[0195]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
r	0.9960	0.9998	0.9998	0.99991

[0196] (4)特异性

[0197] 用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液构成的户尘螨特异性IgE抗体检测试剂盒,分别检测总IgE抗体浓度不低于60IU/mL且不含户尘螨特异性IgE抗体的样本、浓度不低于0.7mg/mL的IgA样本、0.5mg/mL的IgM样本、7mg/mL的IgG样本,各1次。结果显示,测定值均不高于0.35IU/mL,表明本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液检测户尘螨特异性IgE抗体的抗干扰能力较强,用于户尘螨特异性IgE抗体检测时具有良好的特异性(表11)。

[0198] 表11户尘螨特异性IgE抗体检测特异性评价(单位:IU/ml)

[0199]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
IgE	0	0	0	0.03
IgA	0	0	0	0
IgM	0	0	0	0.07
IgG	0.20	0.21	0.15	0.01

[0200] (4)一致性评价

[0201] 以线性范围内浓度均匀分布的临床血清样本(户尘螨特异性IgE抗体浓度:0IU/mL～100IU/mL)为检测样本,分别用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液构成的户尘螨特异性IgE检测试剂盒、Thermo Fisher ImmunoCap系统户尘螨d1过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒(荧光免疫分析法)进行测试,验证本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的户尘螨过敏原溶液检测户尘螨特异性IgE抗体与Thermo Fisher ImmunoCap系统试剂盒的一致性。散点图符合率分析的结果显示,相关系数R^2＞0.95,表明本发明与Thermo Fisher ImmunoCap系统户尘螨d1过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性和相关性良好(图4)。

[0202] 实施例8:粉尘螨特异性IgE抗体检测性能评价

[0203] (1)准确度

[0204] 分别选用2份粉尘螨阳性血清样本(血清样本1:粉尘螨特异性IgE抗体浓度在30IU/mL～70IU/mL,血清样本2:粉尘螨特异性IgE抗体浓度在71IU/mL～350IU/mL))作为检测样本,加入到粉尘螨弱阳性血清样本(粉尘螨特异性IgE抗体在0.35IU/mL～0.75IU/mL),所加检测样本与弱阳性血清样本的体积比例为1:19,加入检测样本后的血清样本浓度应在检测范围内。用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液构成的粉尘螨特异性IgE检测试剂盒,对每个样本重复检测3次,计算平均值(C),按实施例7公式(3)计算回收率R。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液检测粉尘螨特异性IgE抗体的回收率均在85%～115%之间(表12)。

[0205] 表12粉尘螨特异性IgE抗体检测准确度评价

[0206]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
回收率	97.43%/113.32%	103.45%/113.93%	87.98%/105.37%	88.6%/103.3%

[0207] (2)精密度

[0208] 用3批次的本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液构成的粉尘螨特异性IgE检测试剂盒,在相同检测条件下分别检测相同的人血清样本的粉尘螨特异性IgE抗体浓度,计算批内变异系数(CV)和批间变异系数(CV)。

[0209] 批内精密度:以粉尘螨特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.7IU/mL及3.5IU/mL～17.5IU/mL的人血清样本作为检测样本,重复测试10次,分别计算批次内的测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批内变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液检测粉尘螨特异性IgE抗体的批内CV均小于10%(表13)。

[0210] 批间精密度:以粉尘螨特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.7IU/mL及3.5IU/mL～17.5IU/mL的人血清样本为检测样本,重复测试10次,分别计算3批次30个测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批间变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液检测粉尘螨特异性IgE抗体的批间CV小于20%(表13)。

[0211] 表13粉尘螨特异性IgE抗体检测精密度评价

[0212]

指标说明	批次 1	批次 2	批次 3	注册检验批
批内 CV	3.80%/2.41%	4.20%/2.35%	3.39%/1.98%	0.68IU/mL：3.8% 8.04IU/mL：2.3%
批间 CV	11.70%/9.80%			0.68IU/mL：3.5% 8.04IU/mL：3.4%

[0213] (3)线性

[0214] 用标准品稀释缓冲液稀释接近线性范围上限(100IU/mL)的高浓度样本,混合成5个浓度在0.35IU/mL～100IU/mL范围的样本,对每个浓度的样本重复检测3次,计算每个稀释浓度的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以检测结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(4)计算线性回归的相关系数(r),r均大于0.9900(表14)。

[0215] 表14粉尘螨特异性IgE抗体检测线性评价

[0216]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
r	0.9979	0.9996	0.9998	0.99784

[0217] (4)特异性

[0218] 用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液构成的粉尘螨特异性IgE抗体检测试剂盒,分别检测总IgE抗体浓度不低于60IU/mL且不含粉尘螨特异性IgE抗体的样本、浓度不低于0.7mg/mL的IgA样本、0.5mg/mL的IgM样本、7mg/mL的IgG样本,各1次。结果显示,检测值均不高于0.35IU/mL,表明本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液检测粉尘螨特异性IgE抗体的抗干扰能力较强,用于粉尘螨特异性IgE抗体检测具有良好的特异性(表15)。

[0219] 表15粉尘螨特异性IgE抗体检测线性评价

[0220]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
IgE	0	0	0	0
IgA	0	0	0	0
IgM	0	0	0	0.27
IgG	0.18	0.23	0.18	0.07

[0221] (5)一致性评价

[0222] 以线性范围内浓度均匀分布的临床血清样本(粉尘螨特异性IgE抗体浓度:0IU/mL～100IU/mL)为检测样本,分别用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液构成的粉尘螨特异性IgE抗体检测试剂盒、Thermo Fisher ImmunoCap系统粉尘螨d2过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒(荧光免疫分析法)进行测试,验证本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的粉尘螨过敏原溶液检测粉尘螨特异性IgE抗体与Thermo Fisher ImmunoCap系统试剂盒的一致性。散点图符合率分析的结果显示,相关系数R^2＞0.95,表明本发明与Thermo Fisher ImmunoCap系统粉尘螨d2过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性和相关性良好(图5)。

[0223] 实施例9:艾蒿特异性IgE抗体检测性能评价

[0224] (1)准确度

[0225] 分别选用2份艾蒿阳性血清样本(血清样本1:艾蒿特异性IgE抗体浓度在30IU/mL～70IU/mL,血清样本2:艾蒿特异性IgE抗体浓度在71IU/mL～350IU/mL)作为检测样本,加入到艾蒿弱阳性血清样本(艾蒿特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.75IU/mL),所加检测样本与弱阳性血清样本的体积比例为1:19,加入检测样本后的血清样本浓度应在检测范围内。用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液构成的艾蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,对每个样本重复检测3次,计算平均值(C),按实施例7公式(3)计算回收率R。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液检测艾蒿特异性IgE抗体的回收率均在85%～115%之间(表16)。

[0226] 表16艾蒿特异性IgE抗体检测准确度评价

[0227]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
回收率	86.32%/105.1%	85.4%/95.5%	95.3%/111.2%	104.2%/93.2%

[0228] (2)精密度

[0229] 用3批次的本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液构成的艾蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,在相同检测条件下分别检测相同的人血清样本的艾蒿特异性IgE抗体浓度,计算批内变异系数(CV)和批间变异系数(CV)。

[0230] 批内精密度:以艾蒿特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.7IU/mL及3.5IU/mL～17.5IU/mL的人血清样本作为检测样本,重复测试10次,分别计算批次内的测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批内变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液检测艾蒿特异性IgE抗体的批内CV均小于10%(表17)。

[0231] 批间精密度:以艾蒿特异性IgE抗体浓度在0.35IU/mL～0.7IU/mL及3.5IU/mL～17.5IU/mL的人血清样本为检测样本,重复测试10次,分别计算3批次30个测量值的平均值

($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批间变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液检测艾蒿特异性IgE抗体的批间CV小于20%(表17)。

[0232] 表17艾蒿特异性IgE抗体检测精密度评价

[0233]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
批内CV	7.84%/3.58%	3.38%/1.58%	2.09%/1.05%	0.49IU/mL：3.1% 5.15IU/mL：0.9%
批间CV	5.14%/3.62%			0.49IU/mL：6.5% 5.15IU/mL：2.1%

[0234] (3)线性

[0235] 用标准品稀释缓冲液稀释接近线性范围上限(100IU/mL)的高浓度样本,混合成5个浓度在0.35IU/mL～100IU/mL范围的样本,对每个浓度的样本重复检测3次,计算每个稀释浓度的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以检测结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(4)计算线性回归的相关系数(r),r均大于0.9900(表18)。

[0236] 表18艾蒿特异性IgE抗体检测线性评价

[0237]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
r	0.9969	0.9992	0.9994	0.99952

[0238] (4)特异性

[0239] 用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液构成的艾蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,分别检测总IgE抗体浓度不低于60IU/mL且不含艾蒿特异性IgE抗体的样本、浓度不低于0.7mg/mL的IgA样本、0.5mg/mL的IgM样本、7mg/mL的IgG样本,各1次。结果显示,检测值均不高于0.35IU/mL,表明本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液检测艾蒿特异性IgE抗体抗干扰能力较强,用于艾蒿特异性IgE抗体检测具有良好的特异性(表19)。

[0240] 表19艾蒿特异性IgE抗体检测特异性评价

[0241]

指标说明	批次1	批次2	批次3批	注册检验批
IgE	0	0	0	0
IgA	0	0	0	0
IgM	0	0	0	0.04
IgG	0	0	0	0

[0242] (5)一致性评价

[0243] 以线性范围内浓度均匀分布的临床血清样本(艾蒿特异性IgE抗体浓度:0IU/mL～100IU/mL)为检测样本,分别用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液构成的艾蒿特异性IgE抗体检测试剂盒、Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒(荧光免疫分析法)进行测试,验证本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的艾蒿过敏原溶液检测艾蒿特异性IgE抗体与Thermo Fisher ImmunoCap系统试剂盒的一致性。散点图符合率分析的结果显示,相关系数R^2＞0.95,表明本发明与Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性和相关性良好(图6)。

[0244] 实施例10:黄花蒿特异性IgE抗体检测性能评价

[0245] 目前市面上尚无商品化的黄花蒿特异性IgE抗体定量检测试剂盒,对于疑似黄花蒿过敏的患者,临床上常采用黄花蒿花粉点刺液通过皮肤点刺试验进行诊断,或者使用蒿属花粉特异性IgE检测试剂盒辅助诊断。鉴于当前市场上无黄花蒿特异性IgE抗体定量检测试剂盒以及黄花蒿和艾蒿花粉主要致敏原具有非常高的同源性,本实施例中,黄花蒿阳性血清采用Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒(荧光免疫分析法)进行定值,开展准确度和一致性指标的评价。

[0246] (1)准确度

[0247] 分别选用2份黄花蒿阳性血清样本(血清样本1:黄花蒿特异性IgE抗体浓度在30IU/mL～70IU/mL,血清样本2:黄花蒿特异性IgE抗体浓度在71IU/mL～350IU/mL))作为检测样本,加入到黄花蒿弱阳性血清样本(黄花蒿特异性IgE抗体在0.35IU/mL～0.75IU/mL),所加检测样本与弱阳性血清样本的体积比例为1:19,加入检测样本后的血清样本浓度应在检测范围内。用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液构成的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,对每个样本重复检测3次,计算平均值(C),按实施例7公式(3)计算回收率R。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液检测黄花蒿特异性IgE抗体的回收率均在85%～115%之间(表20)。

[0248] 表20黄花蒿特异性IgE抗体检测准确度评价

[0249]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
回收率	97.6%/102.7%	91.2%/100.7%	98.7%/105.1%	88.7%/104.3%

[0250] (2)精密度:

[0251] 用3批次的本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液构成的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,在相同检测条件下分别检测相同的人血清样本的黄花蒿特异性IgE抗体浓度,计算批内变异系数(CV)和批间变异系数(CV)。

[0252] 批内精密度:以皮肤点刺结果显示黄花蒿“+”及“+++”(3.5IU/mL～17.5IU/mL)的人血清样本作为检测样本,重复测试10次,分别计算批次内的测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批内变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液检测黄花蒿特异性IgE抗体的批内CV均小于10%(表21)。

[0253] 批间精密度:以皮肤点刺结果显示黄花蒿“+”及“+++”(3.5IU/mL～17.5IU/mL)的人血清样本作为检测样本,重复测试10次,分别计算3批次30个测量值的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),按实施例4公式(1)计算批间变异系数(CV)。结果显示,3批次本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液检测黄花蒿特异性IgE抗体的批间CV小于20%(表21)。

[0254] 表21黄花蒿特异性IgE抗体检测精密度评价

[0255]

指标说明	批次 1	批次 2	批次 3	注册检验批
批内 CV	5.48%	3.25%	3.44%	0.46IU/mL: 4.2% 4.67IU/mL: 1.8%
批间 CV	5.90%			0.46IU/mL: 4.2% 4.67IU/mL: 3.0%

[0256] (3)线性

[0257] 用标准品稀释缓冲液稀释接近线性范围上限(皮肤点刺结果显示黄花蒿“+++++”)的高浓度样本,混合成5个浓度,对每个浓度的样本重复检测3次,计算每个稀释浓度的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以检测结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(4)计算线性回归的相关系数(r),r均大于0.9900(表22)。

[0258] 表22黄花蒿特异性IgE抗体检测线性评价

[0259]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
r	0.9939	0.9979	0.9998	0.99996

[0260] (4)特异性

[0261] 用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液构成的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒,分别检测总IgE浓度不低于60IU/mL且不含黄花蒿特异性IgE抗体的样本、浓度不低于0.7mg/mL的IgA样本、0.5mg/mL的IgM样本、7mg/mL的IgG样本,各1次。结果显示,检测值均不高于0.35IU/mL,表明本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液检测黄花蒿特异性IgE抗体抗干扰能力较强,用于黄花蒿特异性IgE抗体检测具有良好的特异性(表23)。

[0262] 表23黄花蒿特异性IgE抗体检测特异性评价

[0263]

指标说明	批次1	批次2	批次3	注册检验批
IgE	0	0	0	0
IgA	0	0	0	0
IgM	0	0	0	0.02
IgG	0	0	0	0

[0264] (5)一致性评价

[0265] 以线性范围内浓度均匀分布的临床血清样本(黄花蒿特异性IgE抗体:0IU/mL～100IU/mL)为检测样本,分别用本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液构成的黄花蒿特异性IgE抗体检测试剂盒、Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒(荧光免疫分析法)进行测试,验证本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的黄花蒿过敏原溶液检测黄花蒿特异性IgE抗体与Thermo Fisher ImmunoCap系统试剂盒的一致性。散点图符合率分析的结果显示,相关系数R^2>0.95,表明本发明s与Thermo Fisher ImmunoCap系统艾蒿w6过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒的一致性和相关性良好相关性良好(图7)。

[0266] 实施例7～10的结果表明,本发明人IgE抗体检测试剂盒配合生物素标记的过敏原溶液,用于过敏原特异性IgE抗体定量检测具有良好的准确度、精密度、线性以及特异性,与过敏原特异性IgE检测临床“金标准”ImmunoCap系统的检测结果具有良好的一致性和相关性,检测性能优异、检测结果可靠稳定,且通用性强,适用于各种过敏原特异性IgE抗体的检测。此外,除实施例所例举的过敏原,本发明人IgE抗体检测试剂盒配合其他生物素标记的过敏原溶液进行过敏原特异性IgE抗体的定量检测,同样显示良好的检测性能以及与“金标准”的一致性和相关性。

[0267] 本发明人IgE抗体检测试剂盒用于过敏原特异性IgE抗体检测显示良好的检测性能和稳定可靠的检测结果也表明,本发明第一重组抗人IgE抗体和第二重组抗人IgE抗体组

合使用能够很好地识别和匹配人IgE蛋白表位,对人IgE抗体检测具有优势,且均一性和抗干扰能力佳,稳定性好,有利于人IgE抗体检测试剂盒的质量控制。

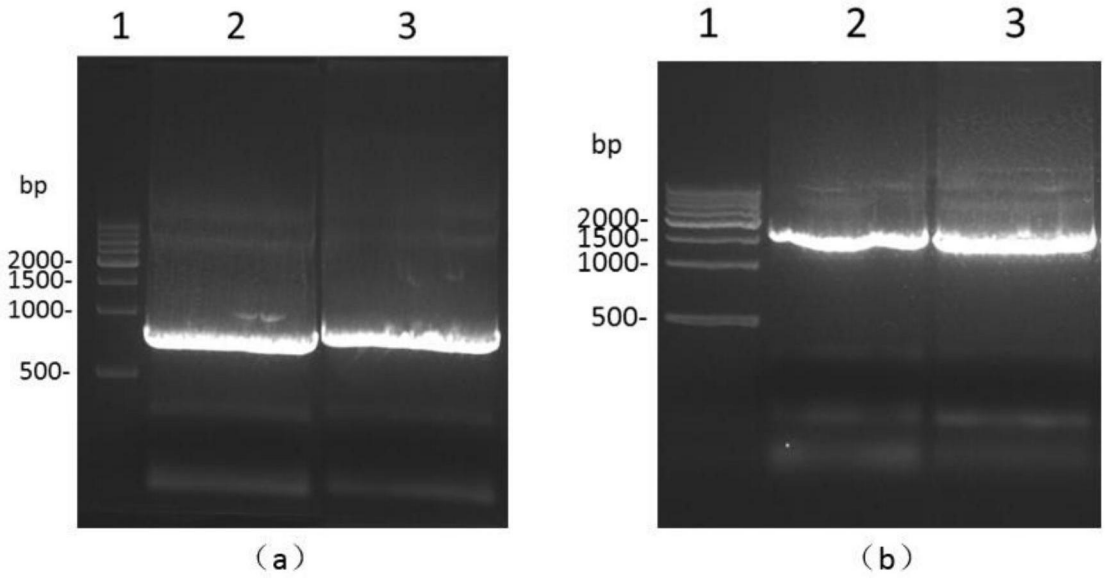
1
2
3
bp
2000-
1500-
1000-
500-
（a）
1
2
3
bp
2000-
1500-
1000-
500-
（b）

图1

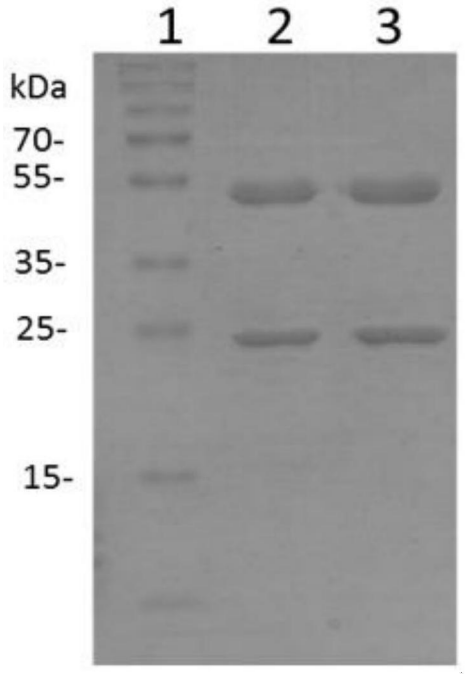
1
2
3
kDa
70-
55-
35-
25-
15-

图2

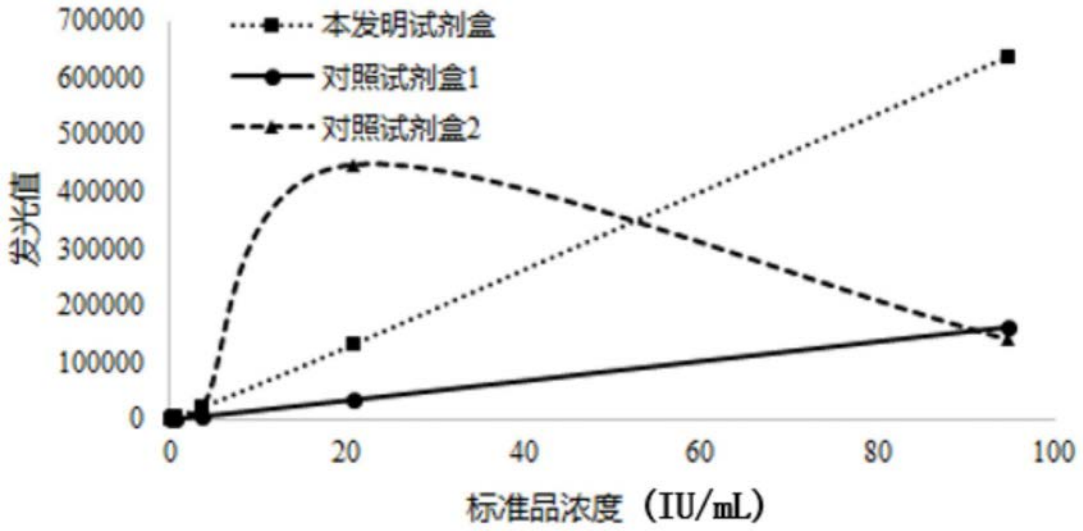
本发明试剂盒
对照试剂盒1
对照试剂盒2
发光值
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
20
40
60
80
100
标准品浓度（IU/mL）

图3

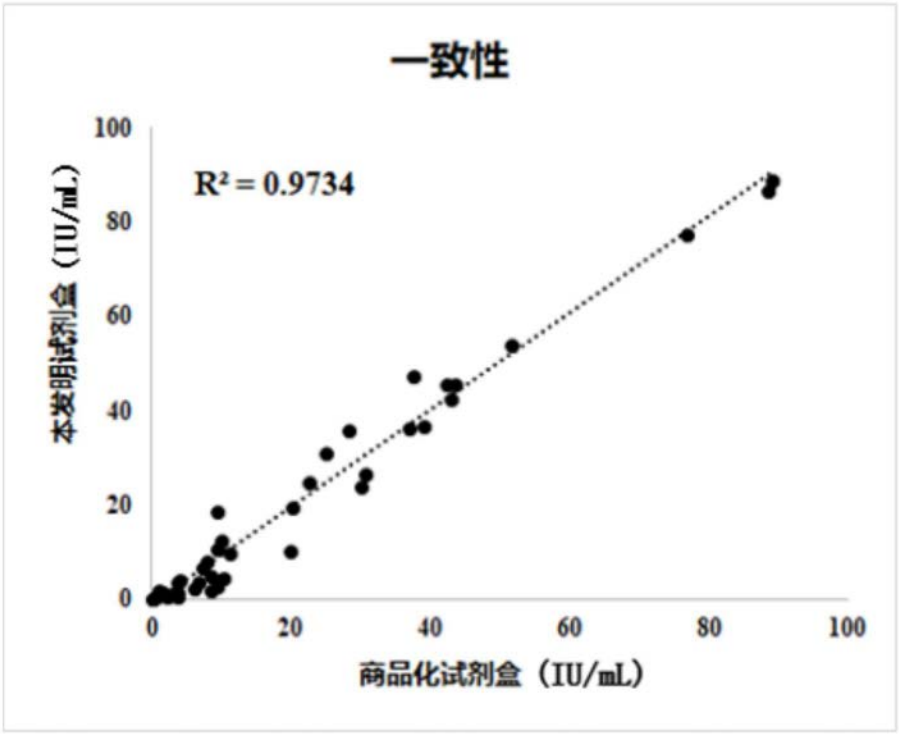
一致性
R² = 0.9734
本发明试剂盒（IU/mL）
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
商品化试剂盒（IU/mL）

图4

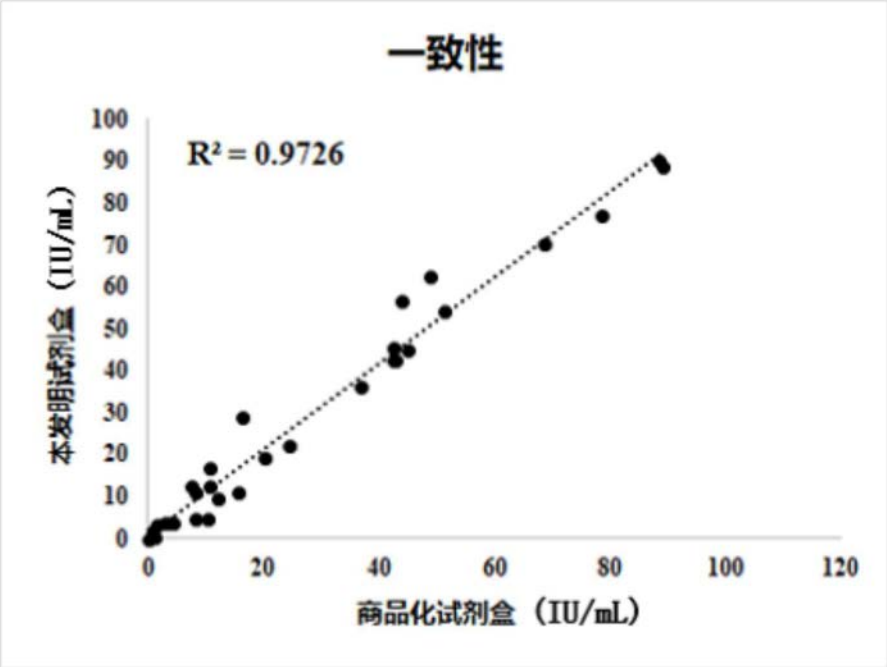
一致性
R² = 0.9726
本发明试剂盒（IU/mL）
商品化试剂盒（IU/mL）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
20
40
60
80
100
120

图5

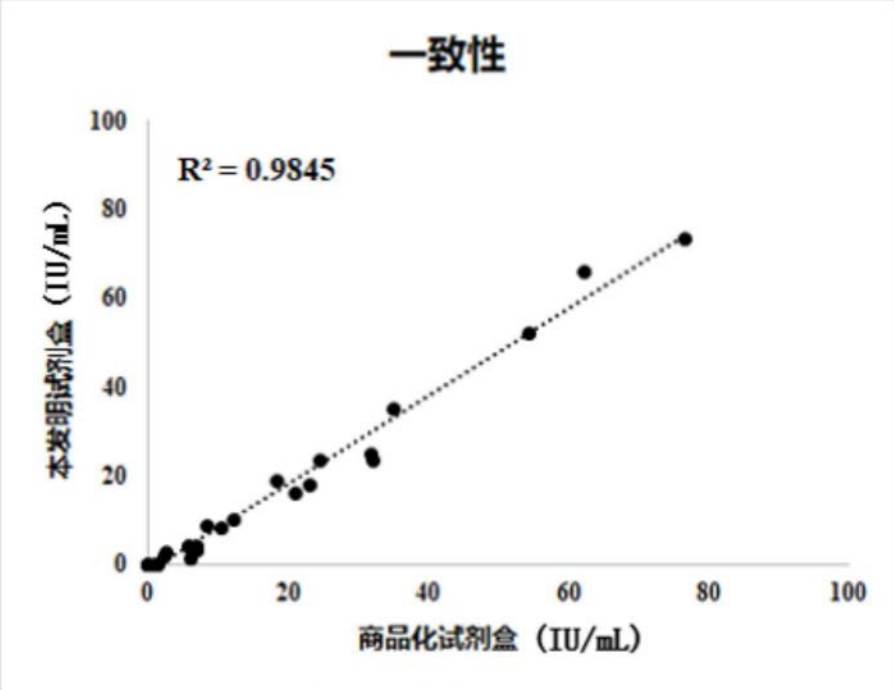
一致性
R² = 0.9845
本发明试剂盒（IU/mL）
商品化试剂盒（IU/mL）
0
20
40
60
80
100
0
20
40
60
80
100

图6

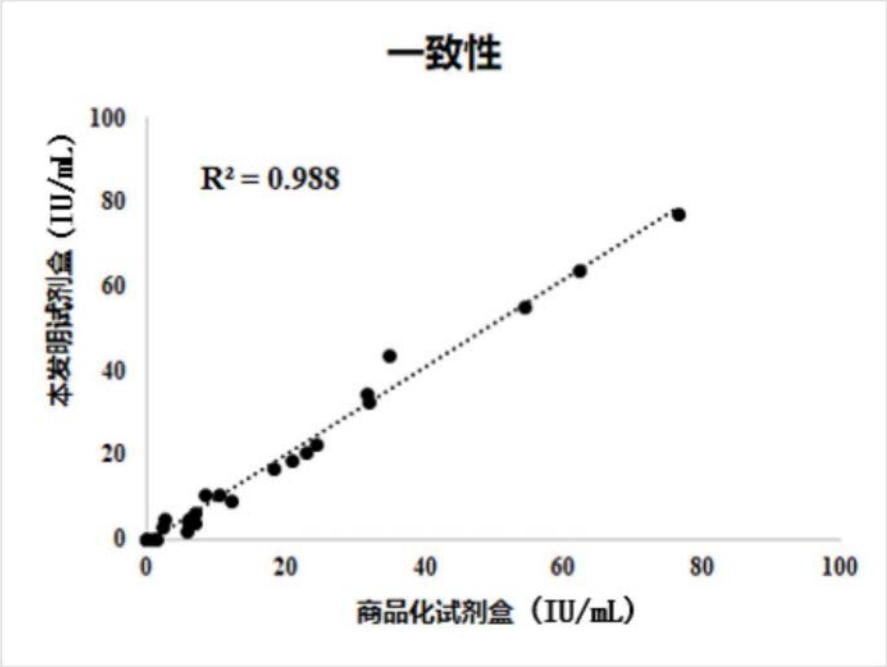

图7