



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110716052 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 201910749882.4

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2019.08.14

G01N 33/573 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/558 (2006.01)

申请公布号 CN 110716052 A

G01N 33/543 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.01.21

(56) 对比文件

(73) 专利权人 武汉大白小白科技有限公司

CN 204359796 U, 2015.05.27

地址 430078 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道858号九龙生物产业基地生物医药产业园加速区二期A84-1 四层

CN 103033624 A, 2013.04.10

CN 204330777 U, 2015.05.13

CN 108445215 A, 2018.08.24

CN 104950111 A, 2015.09.30

CN 104122395 A, 2014.10.29

CN 101377501 A, 2009.03.04

US 2008090252 A1, 2008.04.17

CN 102192976 A, 2011.09.21

(72) 发明人 殷丽

审查员 陈剑锋

(74) 专利代理机构 广州博联知识产权代理有限公司 44663

专利代理师 孙倩倩

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

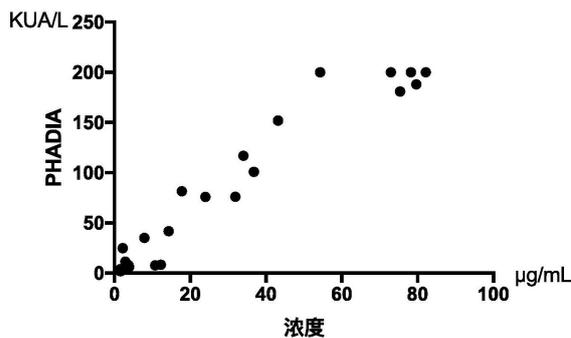
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒及其应用。本发明的两种试剂盒采用的是“双抗体夹心一步法”的反应模式,可以同时对人体血清及鼻分泌物样本中的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶分子进行非常专一的定量及定性检测。它既有效地利用了化学发光技术原理,又在酶联免疫分析的基础上应用酶催化发光底物,提高了检测的灵敏度,同时也具有稳定性高、特异性好、准确性佳、操作简单及无放射性污染的优点,可为支气管哮喘、鼻窦炎、鼻炎等炎症疾病的临床诊断提供更为特异、快速、可靠的依据。



1. 一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒,其特征在於,包括以下两种类型:

A) 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的化学发光免疫检测试剂盒和化学显色免疫检测试剂盒,其组分包括:

①人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和人髓过氧化物酶标准品;

②包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的载体,所述包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的载体的制备方法为:以碳酸盐缓冲液为溶剂,将人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体与溶剂混合均匀后,负载于载体上,将载体清洗干净后,采用封闭液封闭载体,干燥后,得到包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的载体;

③标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体;③中所述标记抗体与②中所述包被抗体为配对抗体,分别与人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和人髓过氧化物酶形成双抗-夹心结构;人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白配对抗体和人髓过氧化物酶配对抗体之间无交叉反应;

④用于显色的底物;

B) 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的胶体金法免疫层析检测试剂盒,包括:

①粘贴在底板一端的上样垫;

②与上样垫紧密压接的含有标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的胶体金垫,所述胶体金垫的制备过程为:以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,在胶体金溶液中加入标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体,室温搅拌2 小时,加入终浓度为1%牛血清白蛋白,1%聚乙二醇20000封闭20min,离心,弃上清,用胶体金工作液复溶,将溶液均匀地铺在玻璃纤维膜或无纺布上制成胶体金垫;

③与胶体金垫一端紧密压接的硝酸纤维素NC膜,硝酸纤维素NC 膜上包被有相互分离的检测线T和质控线C,所述检测线T上包被有与②所述标记抗体配对的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体,所述质控线C上包被有羊抗鼠IgG抗体;所述检测线T上的包被抗体和②中所述标记抗体为配对抗体,分别与人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和人髓过氧化物酶形成双抗-夹心结构;人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白配对抗体和人髓过氧化物酶配对抗体之间无交叉反应;

其中,所述硝酸纤维素NC膜的制备为:NC膜包被用0.01M pH7.4PBS将包被人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶抗体稀释成0.5mg/ml、1mg/ml或1.5mg/ml,羊抗鼠IgG分别稀释成1mg/ml或2mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.2u1/cm进行分别划线包被,包被完成后将NC膜在温度20~25℃,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时;

④与硝酸纤维素NC膜紧密压接的吸样垫;

其中,试剂盒被配置为用于检测鼻腔分泌物中的炎症因子。

2. 根据权利要求1所述的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒,其特征在於,所述载体为微孔板、磁性颗粒、塑料管或塑料珠。

3. 根据权利要求1所述的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒,其特征在于,A)中所述用于标记的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求1所述的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒,其特征在于,A)中所述化学发光免疫检测试剂盒中的显色底物为鲁米诺、异鲁米诺、(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷、CSPD 或CDP-Star;所述化学显色免疫检测试剂盒中显色底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺、或二氨基联苯胺。

人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 变应性鼻炎(allergic rhinitis,AR)和慢性鼻窦炎(chronic rhinosinusitis,CRS)同为耳鼻喉头颈外科最常见的疾病。其诊断常常依靠患者的症状和体征。鼻分泌物细胞学检查作为重要的辅助诊断方法,有助于鼻炎患者的精确诊断和个体化治疗,因为操作繁琐且缺乏统一标准,在临床上虽有开展但应用并不广泛。在我们此前鼻分泌物细胞学研究中,可以确定嗜酸性粒细胞和中性粒细胞在鼻分泌物中占绝大多数(>98%),AR患者鼻分泌物多以嗜酸性粒细胞为主要特征表现,CRS患者鼻分泌物则以中性粒细胞为主。由于鼻分泌物学检查的取样过程有一定的不稳定性,且可受到患者就诊时状况的影响和制约(如分泌物量过少、患者不配合等),导致结果的准确性受到影响。相比之下鼻分泌物的获取更为简便稳定。嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)是一种碱性蛋白质,是反映嗜酸性粒细胞活化量的重要指标,是过敏性患者临床检验的标志之一。髓过氧化物酶(MPO)是含血红素辅基的血红素蛋白酶,也是中性粒细胞中储存最丰富的促炎酶,能反映中性粒细胞的活化情况。

[0003] 目前在临床上没有对鼻腔炎症性质进行判断的产品,没有竞品,甚至是没有产品。医生对鼻腔炎症的判断及治疗的调整,完全依靠经验进行。ECP及MPO在临床上具有广泛而重要的应用价值;对鼻腔局部炎症进行精确判断,从而指导鼻炎的精准治疗,并对治疗效果进行客观评价。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术的不足,目的在于提供一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒及其应用。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明所采用的技术方案为:

[0006] 一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒,包括以下两种类型:

[0007] A) 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA),其组分包括:

[0008] ①人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和人髓过氧化物酶标准品;

[0009] ②包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的载体;

[0010] ③标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体;
③中所述标记抗体与②中所述包被抗体为配对抗体,分别与人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和人髓过氧化物酶形成双抗-夹心结构;人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白配对抗体和人髓过氧化物酶配对抗体之间无交叉反应;

[0011] ④用于显色的底物；

[0012] B) 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的免疫层析检测试剂盒(胶体金)，包括：

[0013] ①粘贴在底板一端的上样垫；

[0014] ②与上样垫紧密压接的含有标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的胶体金垫；

[0015] ③与胶体金垫一端紧密压接的硝酸纤维素NC膜，硝酸纤维素NC膜上包被有相互分离的检测线T和质控线C，所述检测线T上包被有与②所述标记抗体配对的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体，所述质控线C上包被有羊抗鼠IgG抗体；所述检测线T上的包被抗体和②中所述标记抗体为配对抗体，分别与人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和人髓过氧化物酶形成双抗-夹心结构；人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白配对抗体和人髓过氧化物酶配对抗体之间无交叉反应；

[0016] ④与硝酸纤维素NC膜紧密压接的吸样垫。

[0017] 上述方案中，A) 中所述包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的载体的制备方法为：以碳酸盐缓冲液为溶剂，将人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体与溶剂混合均匀后，负载于载体上，将载体清洗干净后，采用封闭液封闭载体，干燥后，得到包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的载体。

[0018] 上述方案中，所述载体为微孔板、磁性颗粒、塑料管或塑料珠。

[0019] 上述方案中，A) 中所述用于标记的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0020] 上述方案中，A) 中所述化学发光免疫检测试剂盒中的显色底物为鲁米诺、异鲁米诺、(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷、CSPD或CDP-Star；所述化学显色免疫检测试剂盒中显色底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺、或二氨基联苯胺。

[0021] 上述方案中，B) 中所述胶体金垫的制备过程为：以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，在胶体金溶液中加入标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体，室温搅拌2小时，加入终浓度为1%牛血清白蛋白，1%聚乙二醇20000封闭20min，离心，弃上清，用胶体金工作液复溶，将溶液均匀地铺在玻璃纤维膜或无纺布上制成胶体金垫。

[0022] 上述嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶检测试剂盒在同步检测嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶产品中的应用。

[0023] 本发明的有益效果：本发明的两种试剂盒采用的是“双抗体夹心一步法”的反应模式，可以同时对人体血清及鼻分泌物样本中的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶分子进行非常专一的定量及定性检测。人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA)既有效地利用了化学发光技术原理，又在酶联免疫分析的基础上应用酶催化发光底物，提高了检测的灵敏度，同时也具有稳定性高、特异性好、准确性佳、操作简单及无放射性污染的优点。人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的免疫层析检测试剂盒(胶体金)测定结果准确、稳定和可靠；特别适用于基层和农村广大人民群众的健康需求，可为支气管哮喘、鼻窦炎、鼻炎等炎症疾病

的临床诊断提供更为特异、快速、可靠的依据。

附图说明

[0024] 图1为实施例2所述人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的免疫层析检测试剂盒(胶体金)的检测结果示例图。

[0025] 图2为实施例3所制备的试剂盒中标准品线性图。

[0026] 图3为本发明的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和美国Thermo Fisher Scientific公司ECP免疫荧光测定试剂盒检测结果相关性结果,结果显示,检测30例样本中ECP的含量,结果相关性达到 $r=0.9757$ ($P<0.0001$)。

具体实施方式

[0027] 为了更好地理解本发明,下面结合实施例进一步阐明本发明的内容,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0028] 实施例1

[0029] 一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA),包括以下组份:

[0030] 1) 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶蛋白标准品;

[0031] 2) 包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白的单克隆抗体和人髓过氧化物酶单克隆抗体的微孔板;

[0032] 3) 辣根过氧化物酶标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和髓过氧化物酶的单克隆抗体;

[0033] 4) 上述酶所作用的化学发光底物AMPPD;

[0034] 其中:

[0035] 1. 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶标准品用下述方法制成:将0.02mol/L, pH值为7.4的磷酸盐缓冲液与胎牛血清按体积比4:1的比例混合配制成基础缓冲液,用基础缓冲液将人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶分别稀释成浓度为0、25、64、160、400、1000ng/mL。

[0036] 2. 包被有人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和髓过氧化物酶单克隆抗体的微孔板的制备步骤为:

[0037] 1) 采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和髓过氧化物酶单克隆抗体混合,配成浓度为5 μ g/mL的混合液,加入微孔板各孔中,每孔120 μ L, 4 $^{\circ}$ C放置24h;

[0038] 2) 用pH值为7.4的PBS清洗微孔板,清洗3次,每孔每次用300 μ L;

[0039] 3) 将pH值为7.3的300 μ L封闭液加入每个清洗后的微孔板中,4 $^{\circ}$ C放置过夜,甩掉封闭液,在吸水纸上拍干,室温除湿干燥24h后立即真空封装,保存于4 $^{\circ}$ C;

[0040] 所述封闭液是用下述方法制成:取8gNaCl、1.43g无水Na₂HPO₄、0.24g无水KH₂PO₄、0.2gKCl、10g BSA、25g蔗糖及0.5mL Proclin300,加去离子水至1000mL。

[0041] 3. 碱性磷酸酶标记的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的单克隆抗体

[0042] 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白单克隆抗体和髓过氧化物酶的单克隆抗体用高碘酸

钠法与辣根过氧化物酶偶联,用pH值为7.3的PBS缓冲液充分透析,在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油,用20%牛血清酶稀释液进行稀释至酶标抗体的浓度为1:10000,-20℃以下保存;

[0043] 所述20%牛血清酶稀释液的配方为:

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9g
NaCl	8.8g
新生牛血清	200mL
Proclin300	1mL
食品红	0.05mL

[0044]

去离子水 定容至 1000mL

[0045] 4. 上述酶所作用的化学发光底物3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷(AMPPD)

[0046] 所述AMPPD化学发光底物的配方为:

三羟甲基氨基甲烷	24g
NaCl	160g
KCl	4g
Proclin300	0.5g
AMPPD	200mL
去离子水	定容至 1000mL

[0047]

[0048] 5. 半成品及成品组成

[0049] 上述步骤所得产品分装即为半成品。随机抽取三份进行特异性、精密度、灵敏度及稳定性检验,合格后组装为人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA)。

[0050] 实验证明:用塑料管替代实施例1步骤2)的微孔板,其它同实施例1,可以制备出相应的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA)。

[0051] 用磁性颗粒或塑料珠替代实施例1步骤2)中的微孔板,并在所述试剂盒中放入空白微孔板或塑料管,其它同实施例1,可以制备出相应的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA);

[0052] 实验证明:用pH值为7.3或7.5的PBS,或7.3、7.4或7.5的PBST替代实施例1步骤2)的pH值为7.4的PBS,其它同实施例1,可以制备出相应的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA);

[0053] 实验证明:用pH值为7.2、7.4或7.5的封闭液替代实施例1步骤2)的pH值为7.3的封闭液,其它同实施例1,可以制备出相应的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA);

[0054] 实验证明:用(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、CSPD或CDP-Star替代实施例1步骤4)的3-

(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷,其它同实施例1,可以制备出相应的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA);

[0055] 实验证明:用pH值为7.2、7.4或7.5的浓缩洗涤液替代实施例1步骤5的pH值为7.3的浓缩洗涤液,其它同实施例1,可以制备出相应的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA)。

[0056] 配对抗体互作:为避免两对配对抗体之间发生非特异性结合,需要排除配对抗体之间互作,设计实验方案如下:

[0057] A. 抗原-抗体之间有无交叉反应:采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与人ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)混合,配成浓度为5 μ g/mL的混合液包被酶标板,用一对MPO抗体分别检测,结果为阴性,MPO抗体无法识别人ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白);

[0058] 采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与人MPO(髓过氧化物酶)混合,配成浓度为5 μ g/mL的混合液包被酶标板,用一对ECP抗体分别检测,结果为阴性,ECP抗体无法识别人MPO(髓过氧化物酶);

[0059] B. 抗体-抗体之间有无交叉反应:采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)和MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体混合,配成浓度均为5 μ g/mL的混合液包被酶标板;同时采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)单克隆抗体混合,配成浓度为5 μ g/mL的混合液包被酶标板;分别用相同浓度梯度的ECP蛋白进行检测,结果显示:包被单一抗体和同时包被两种抗体检测结果一致,说明MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体对于ECP的检测结果显示无影响;

[0060] 采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)和MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体混合,配成浓度均为5 μ g/mL的混合液包被酶标板;同时采用pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液为溶剂与MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体混合,配成浓度为5 μ g/mL的混合液包被酶标板;分别用相同浓度梯度的MPO(髓过氧化物酶)进行检测,结果显示:包被单一抗体和同时包被两种抗体检测结果一致,说明ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)单克隆抗体对于MPO的检测结果显示无影响。

[0061] 使用所述人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)和化学显色免疫检测试剂盒(ELISA)检测人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的方法,包括如下步骤:

[0062] (1) 加样:分别设标准孔、待测样品孔、空白孔;设标准孔7孔,依次加入100 μ L浓度的标准品,空白孔加100 μ L样品稀释液,余孔加待测样品100 μ L,酶标板37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

[0063] (2) 弃去液体,甩干,不用洗涤;

[0064] (3) 每孔加酶标记抗体工作液100 μ L(临用前配制),酶标板37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

[0065] (4) 弃去孔内液体,每孔用250 μ L的洗涤液洗涤,浸泡1分钟,吸去(不可触及板壁)或甩掉酶标板内的液体,在实验台上铺垫几层吸水纸,酶标板朝下用力拍几次(也可轻拍将孔内液体拍干),重复洗板3次,最后一次洗涤后,要把孔内的洗涤液完全甩干;自动洗板机亦可。

[0066] (5) 每孔加生物素标记的链霉亲和素工作液(临用前配制)100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

[0067] (6) 弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤4;

[0068] (7) 每孔加底物溶液100 μ L,酶标板37 $^{\circ}$ C避光显色(反应时间控制在10~15分钟,不要超过20分钟,当标准孔的前3~4孔有明显的梯度蓝色,后3~4孔梯度不明显时,即可终止);

[0069] (8) 每孔加终止溶液50 μ L,终止反应,此时蓝色立转黄色;终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同,如出现颜色不匀一,请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀;

[0070] (9) 在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后,立即用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度(O.D.值)。

[0071] 实施例2

[0072] 一种人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的免疫层析检测试剂盒(胶体金),制备方法如下:

[0073] 1. 金标垫制备:

[0074] 人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶抗体胶体金标记氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为30~40nm的胶体金溶液,制备完成后取三份胶体金,分别用0.2M K_2CO_3 将溶液调到pH7.5、pH8.0和pH8.5;然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每100ml溶液加入0.5mg、1mg、1.5mg将标记用人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶抗体缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌2小时,再加入到终浓度为1%的PEG2000和1%的BSA进行封闭20min,标记结束后以12000r/min离心,弃上清,沉淀按50%原体积复溶至不同配比的胶体金工作液中(pH8.0,含BSA,羊血清,蔗糖和表面活性剂)。然后将标记胶体金溶液按1ml溶液铺20cm²的比例加样于玻璃纤维膜或无纺布上,在温度20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时,制成胶体金垫。

[0075] 2. 包被膜制备:

[0076] NC膜包被用0.01M pH7.4 PBS将包被人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶抗体稀释成0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml,羊抗鼠IgG分别稀释成1mg/ml、2mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.2 μ l/cm进行分别划线包被,包被完成后将NC膜在温度20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时。

[0077] 3. 试纸卡组装:

[0078] 在温度20~25 $^{\circ}$ C,湿度小于40%的干燥室内,取塑底板,将已包被的NC膜放置在塑料底板的中部粘贴,将胶体金垫裁切成合适的宽度,在NC膜T线一侧搭接胶体金垫,搭胶体金垫的1/4粘贴,在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫,搭胶体金垫的1/3粘贴;在NC膜C线一侧搭接吸样垫,搭吸样垫的1/10粘贴;最后用裁剪机将贴好塑料板切成3~5mm宽的试纸条,再装入塑料卡内,形成试纸卡。

[0079] 配对抗体互作:为避免两对配对抗体之间发生非特异性结合,需要排除配对抗体之间互作,设计实验方案如下:

[0080] A. 抗原-抗体之间有无交叉反应:NC膜包被用0.01M pH7.4 PBS将人ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)稀释成0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.2 μ l/cm进行分别划线包被,包被完成后将NC膜在温度20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时。用一对MPO抗体分别检测,结果为阴性,MPO抗体无法识别人ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白);

[0081] NC膜包被用0.01M pH7.4 PBS将人MPO(髓过氧化物酶)稀释成0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.2u1/cm进行分别划线包被,包被完成后将NC膜在温度20~25℃,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时。用一对ECP抗体分别检测,结果为阴性,ECP抗体无法识别人MPO(髓过氧化物酶);

[0082] B. 抗体-抗体之间有无交叉反应:NC膜包被用0.01M pH7.4 PBS将ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)和MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体稀释成0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.2u1/cm进行分别划线包被,包被完成后将NC膜在温度20~25℃,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时;同时用相同工艺包被ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)单克隆抗体;分别用相同浓度梯度的ECP蛋白进行检测,结果显示:包被单一抗体和同时包被两种抗体检测结果一致,说明MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体对于ECP的检测结果显示无影响;

[0083] NC膜包被用0.01M pH7.4 PBS将ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)和MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体稀释成0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.2u1/cm进行分别划线包被,包被完成后将NC膜在温度20~25℃,相对湿度<30%的干燥间干燥2~5小时;同时用相同工艺包被MPO(髓过氧化物酶)单克隆抗体;分别用相同浓度梯度的MPO(髓过氧化物酶)进行检测,结果显示:包被单一抗体和同时包被两种抗体检测结果一致,说明ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)单克隆抗体对于MPO的检测结果显示无影响。

[0084] 使用所述人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的免疫层析检测试剂盒(胶体金)检测人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的检测方法,包括如下步骤:

[0085] (1) 取样:可将取样纸条轻轻放入鼻腔内(如鼻分泌物较多,直接蘸取也可以)。待分泌物浸透纸条的红线后,可将红线以上部分用小剪刀剪下,放入分泌物浸泡瓶中,混合摇匀约10秒钟;

[0086] (2) 加样:取测试笔卡,将浸泡瓶前面的盖子打开,将浸泡液滴10滴至笔卡下端的孔槽中;

[0087] (3) 显色:将测试笔卡垂直放置,可以看到液体向上方浸润,并有红色显现;可静待15~20分钟后进行读数;

[0088] (4) 结果判读:读取标志:最上方的为对照线(C),中间的为MPO(M),最下方的为ECP(E)

[0089] 1) 结果1(如图1(a)所示):如果三条线均显现(C、M、E均显现),则可判断为感染性为主,在治疗上可予抗感染治疗为主;

[0090] 2) 结果1(如图1(b)所示):如果只有上下两条线显现(C与E显现),则可判断为过敏性为主,在治了上可予抗过敏治疗为主;

[0091] 3) 结果1(如图1(c)所示):如果只有第一条C线显现,正常人检测表现为此结果,另有部分非感染性亦非过敏性的鼻炎患者亦可为此结果,则需要根据具体病症情况分析判断并处理。

[0092] 注:①除此3种结果以外的其它显示结果均为不正确,需要重新进行检测。

[0093] ②程度判断:如M或E显色较C线更深则为“+++”,与C线相当则为“++”,弱于C线则为“+”,不显色则为“-”。

[0094] 实施例3本发明的试剂盒的方法学意义

[0095] 鼻分泌物中ECP含量并不能作为诊断AR的独立指标,但结合鼻分泌物中ECP和MPO的表达情况则可以很好的区分AR和CRS。本研究拟通过对鼻腔分泌物中的炎症因子进行分析,对鼻部炎症进行更为精确的诊断,并之成为一种较鼻分泌物细胞学更适用于临床诊断方法。同时,由于AR组和CRS组的炎症因子表达显著高于健康对照组,通过治疗后使ECP和MPO水平降低并接近正常,可望成为鼻炎及鼻窦炎治疗中的客观指标。

[0096] 如附图2(a)所示,AR组和CRS组鼻分泌物中ECP浓度与对照组相比显著升高(AR v.s CONTROL $P=0.0008$;AR v.s CRS $P<0.0001$),且CRS组显著高于AR组($P=0.0056$);与AR组和对照组相比,CRS组鼻分泌物中MPO浓度显著升高(均为 $P<0.0001$),且AR组略高于对照组($P=0.3105$)。

[0097] 如附图2(b)所示,AR组细胞学检查中嗜酸性粒细胞百分比显著高于CRS组和对照组($P<0.0001$),CRS组略高于对照组($P=0.0493$);CRS组细胞学检查中中性粒细胞百分比显著高于AR组和对照组($P<0.0001$),AR组组略高于对照组($P=0.0163$)。(参见附图2)。

[0098] 实施例4

[0099] 本发明的人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的化学发光免疫检测试剂盒(CLIA)的临床应用与美国Thermo Fisher Scientific公司ECP免疫荧光测定试剂盒比较:

[0100] 使用本发明实施例1中制备的试剂盒和美国Thermo Fisher Scientific公司ECP免疫荧光测定试剂盒同时检测变应性鼻炎患者32例,慢性鼻窦炎患者30例,比较两种试剂盒之间的相关性。

[0101] 一、临床血清标本的来源及纳入标准:

[0102] 变应性鼻炎患者32例,男性18例,女性14例,年龄4~41岁,平均(19.9 ± 10.8)岁,纳入标准参照变应性鼻炎诊断和治疗指南(2015年,天津):①症状:打喷嚏、清水样涕、鼻痒和鼻塞等症状出现2个或以上,每天症状持续或累计在1h以上,可伴有眼痒、流泪和眼红等眼部症状;②体征:常见鼻黏膜苍白、水肿,鼻腔水样分泌物;③变应原检测:至少一种变应原SPT和/或血清特异性IgE阳性。

[0103] 慢性鼻-鼻窦炎患者30例,男性16例,女性13例,年龄3~28岁,平均(9.2 ± 7.3)岁,纳入标准参照慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南(2012,昆明):①症状:鼻塞、黏性或黏脓性鼻涕中必具其一,可合并头面部胀痛、嗅觉减退或丧失;②鼻内镜检查:来源于内鼻道、嗅裂的黏性或黏脓性分泌物,鼻黏膜充血、水肿,不合并息肉;③影像学检查:鼻窦CT扫描显示窦口鼻道复合体和/或鼻窦黏膜炎性病变。为了减少过敏因素干扰,本研究选取的鼻窦炎均不合并变应性鼻炎。

[0104] 正常人21例,男性2例,女性19例,年龄32~60岁,平均(38.3 ± 5.6)岁,纳入标准:既往无鼻炎病史且近期未患有呼吸道疾病。

[0105] 本实验通过华中科技大学伦理委员会批准。

[0106] 二、使用本发明实施例1的试剂盒和美国Thermo Fisher Scientific公司ECP免疫荧光测定试剂盒(按其说明书操作)分别对上述鼻分泌物标本进行检测,结果经统计学分析处理,表明两种方法检测的结果高度相关,如附图3所示。

[0107] 三、结果

[0108] 使用人嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和髓过氧化物酶的化学发光免疫检测试剂盒

(CLIA) 和美国 Thermo Fisher Scientific 公司 ECP 免疫荧光测定试剂盒检测相同血清标本的对比数据表明, 两种方法高度相关, 相关系数 $r > 0.98$, P 值小于 0.01。说明两种方法具有同等的使用价值。

[0109] 显然, 上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的实例, 而并非对实施方式的限制。对于所属领域的普通技术人员来说, 在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而因此所引申的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

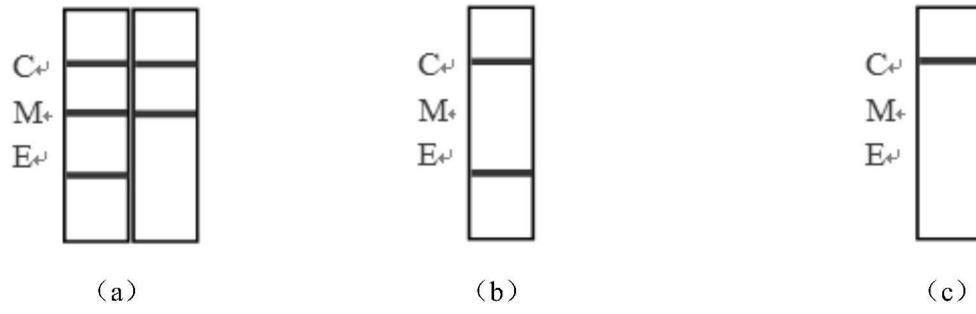


图1

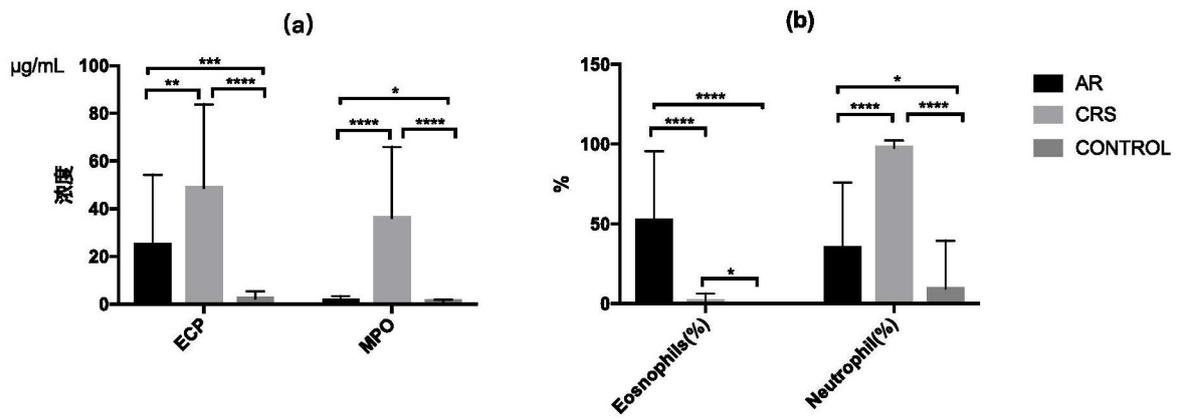


图2

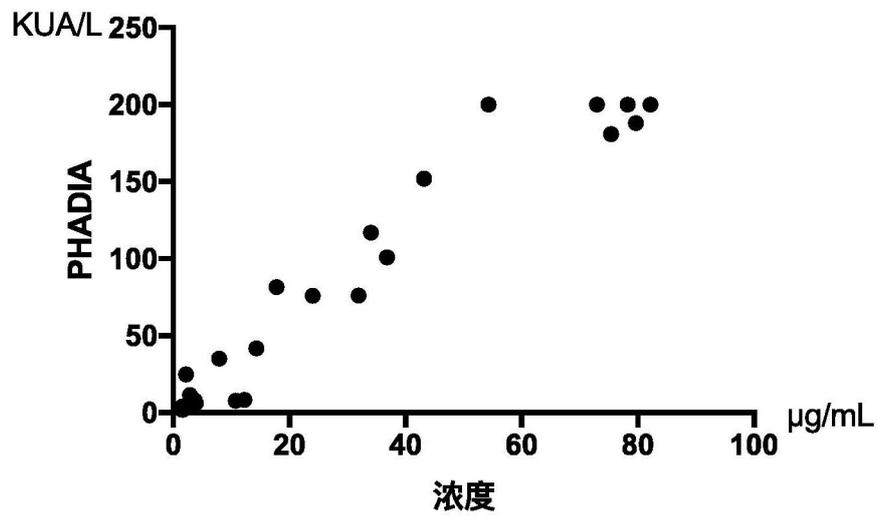


图3