



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102279257 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201110174898. 0

(22) 申请日 2011. 06. 27

(73) 专利权人 刘永庆

地址 250022 山东省济南市历下区阳光新路
阳光 100D3-3-702

(72) 发明人 刘永庆

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 杨琪

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1764838 A, 2006. 04. 26,

CN 1556863 A, 2004. 12. 22,

CN 102033129 A, 2011. 04. 27,

CN 1764838 A, 2006. 04. 26,

CN 1614421 A, 2005. 05. 11,

US 6555320 B1, 2003. 04. 29,

WO 9947164 A1, 1999. 09. 23,

审查员 黄晓丽

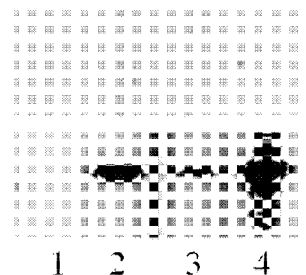
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的
试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒,包括抗体或细胞因子,抗体的抗原或细胞因子的刺激原,以及组成试剂盒所必需的其他反应试剂;所述抗体为两种或两种以上的具有区分不同免疫反应类型功能的抗体或亚类抗体,所述细胞因子为两种或两种以上的具有区分不同免疫反应类型功能的细胞因子。本发明以特有的生物标志作为诊断指标,不但可达到诊断的目的,而且可达到区分一类和二类等不同免疫反应类型的目的。这种诊断的重要意义在于:诊断指标同时还可指明疾病发展的程度,并且能够根据指标在治疗过程中的动态变化,正确指导临床医生及时调整治疗方案,达到恰到好处的治疗,并对预后做出正确的判断。



恶化标志 (IgG1)

康复标志 (IgG2a)

1. 一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒,其特征在于:包括抗体或细胞因子,抗体的抗原或细胞因子的刺激原,以及组成试剂盒所必需的其他反应试剂;

所述抗体的抗原是来源于病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原的纯化蛋白或多肽,或粗纯化的蛋白或多肽,或是灭活的病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原,或人工合成的多肽或蛋白,或是通过基因工程手段表达的多肽或蛋白;

所述细胞因子的刺激原是来源于病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原的纯化蛋白或多肽,或粗纯化的蛋白或多肽,或是灭活的病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原,或人工合成的多肽或蛋白,或是通过基因工程手段表达的多肽或蛋白;

所述抗体为以下①、②两种的组合:①“IgG2a 和 IgG2b”中的一种或两种,②“IgG1 和 IgE”中的一种或两种;

所述细胞因子为以下①、②两种的组合:①“IFN- γ 、IL-2 和 TNF”中的一种或两种以上,②“IL-4、IL-5 和 IL-13”中的一种或两种以上。

一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒。

背景技术

[0002] 到目前为止,人们对细胞内寄生的病原体(病毒、细菌、寄生虫等)所引起的慢性传染病仍缺乏比较有效的治疗办法,疫苗预防效果也不理想。从理论上讲,这类慢性传染病需要宿主产生坚强的一类(Th1)抗感染免疫反应才能清除病原体,但如何诱导机体产生坚强的Th1抗感染免疫反应仍然是个难题。

发明内容

[0003] 针对上述现有技术,本发明提供了一种可用于(动态)诊断人或动物的免疫相关性疾病及正确指导临床治疗的试剂盒。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒,包括抗体或细胞因子,抗体的抗原或细胞因子的刺激原,以及组成试剂盒所必需的其他反应试剂;所述抗体为两种或两种以上的具有区分不同免疫反应类型功能的抗体或亚类抗体,所述细胞因子为两种或两种以上的具有区分不同免疫反应类型功能的细胞因子。

[0006] 所述抗体的抗原是来源于病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原等的纯化蛋白或多肽,或粗纯化的蛋白或多肽,或是灭活的病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原等,或人工合成的多肽或蛋白,或是通过基因工程手段表达的多肽或蛋白。

[0007] 所述细胞因子的刺激原是来源于病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原等的纯化蛋白或多肽,或粗纯化的蛋白或多肽,或是灭活的病原体或癌细胞或癌组织或过敏原或自身免疫原或器官或组织移植排斥原等,或人工合成的多肽或蛋白,或是通过基因工程手段表达的多肽或蛋白。

[0008] 举例:所述抗体即可以为不分类的所有抗体,也可以为两种不同组合中各自抗体之一种或全部:(1) IgG2a 和 IgG2b,其代表一类(Th1)免疫反应;(2) IgG1 和 IgE,代表二类(Th2)免疫反应;(3) IgE 和 IgG1,代表过敏反应指标;(4) IgA 和 IgG4,代表抗过敏指标(也是Th17, Treg等类型的指标)。

[0009] 所述细胞因子即可以为以下组合中之一或全部,也可以为两种不同组合中各自细胞因子之一种或两种以上:(1) IFN- γ 、IL-2、TNF,代表Th1免疫反应类型;(2) IL-4、IL-5、IL-13,代表Th2免疫反应类型;(3) IL-17、IL-6,代表Th17免疫反应类型,;(4) TGF β 和IL-10,代表抗免疫反应类型(以Treg或类Treg细胞为主的类型)。

[0010] 本发明中,测定不同种类的抗体和/或抗体亚类以及测定不同种类的细胞因子所用的抗原或细胞生长刺激原可以是来源于病原体(或癌细胞/癌组织,或过敏原,或自身免疫原,或器官或组织移植排斥原,等等)的纯化蛋白或多肽,或粗纯化的蛋白或多肽,也可

以是灭活的病原体（破碎或不破碎）或癌细胞 / 癌组织,或过敏原,或自身免疫原,或器官或组织移植排斥原,或者是人工合成的多肽或蛋白,或者是通过基因工程手段表达的多肽或蛋白,等等。

[0011] 本发明的诊断试剂盒的使用方法如下：

[0012] 1. 测定抗体和 / 或抗体亚类法 :选用合适的特异性抗原做成抗原诊断液,收集患者血清或体液作为待测样品,用适当方法去测定样品中是否有特异性抗体存在,即可进行早期和快速诊断 ;选用合适的特异性抗原去测定血清或体液中的一对 (或多个) 具有指示康复和恶化意义 (或不同免疫反应类型) 的特异性抗体或抗体亚类,即可可进行动态诊断 ;具体方法可采用 ELISA、WEST BLOT,胶体金技术,等等。

[0013] 2. 测定不同种类的细胞因子法 :选用合适的特异性抗原,抗原与抗原递呈细胞 (APC) 共培养数小时或过夜,洗涤 APC 并适当照光 (使其失去分裂繁殖能力),然后,将 APC 按适当比例与宿主 CD4⁺T 淋巴细胞体外共培养 2 ~ 4 天,收集上清液,用 ELISA 等方法测定细胞因子的含量。也可用 ELISPOT 和流式细胞仪等方法去测定不同种类的细胞因子产生细胞。根据不同种类细胞因子含量的动态变化或不同种类的细胞因子产生细胞数量的动态变化来对疾病的性质作出动态诊断。

[0014] 本发明的诊断试剂盒选用混合的生物标志作指标可进行早期和快速诊断 ;选用一对 (或多个) 合适的生物标志作指标可进行动态诊断。

[0015] 本发明的技术还可进一步推广应用到癌症、过敏反应、自身免疫病、器官和组织移植等与免疫相关的疾病诊断和治疗中去。

[0016] 根据申请人长期的探索研究发现,细胞内寄生的病原体 (病毒、细菌、寄生虫等) 所引起的慢性传染病的临床发病阶段大多数都表现为很强的二类 (Th2) 抗感染免疫反应,即以 Th2 抗感染免疫反应为主 ;而亚临床感染则大多数都表现为很强的 Th1 抗感染免疫反应,即以 Th1 抗感染免疫反应为主。进一步的研究证明,一类和二类免疫反应的产生并不是同步发生的、相辅相成的形式,而是相互抑制的,此起彼伏的形式。根据这种特点,申请人在研究中发现了一类、二类及其他免疫反应类型特有的生物标志,以此生物标志作为诊断指标,不但可达到诊断的目的,而且可达到区分一类和二类等不同免疫反应类型的目的。这种诊断的重要意义在于 :诊断指标同时还可指明疾病发展的程度,并且能够根据指标在治疗过程中的动态变化,正确指导临床医生及时调整治疗方案,达到恰到好处的治疗,并对预后做出正确的判断。除此之外,该指标还可正确指导临床医生利用最新的生物学治疗技术恰到好处的进行治疗 (即选择合适的药物、时间和剂量),因为不适当的应用生物学治疗技术可能会加速疾病的恶化。

附图说明

[0017] 图 1 :免疫小鼠攻击肿瘤后时间 - 检测指标变化图,其中,1、2、3、4 代表 1、2、3、4 周 ;图中可见,1-4 周内恶化标志阴性,康复标志阳性,指示机体自身的特异性抗肿瘤免疫力强劲,瘤细胞在体内逐渐消亡。

[0018] 图 2 :未免疫小鼠攻击肿瘤后时间 - 检测指标变化图,其中,1、2、3、4 代表 1、2、3、4 周,图中可见,1-4 周内恶化标志阳性,康复标志阴性,指示机体自身的特异性抗肿瘤免疫力很弱,瘤细胞在体内大量增殖,于第 5 周死亡。

[0019] 图3:肿瘤手术后时间-检测指标变化图,其中,横坐标的数字的单位为:周;图中可见,-2周指示在肿瘤接种前抗体呈阴性反应。1-8周指示瘤细胞在体内逐渐消亡;10-15周指示残留瘤细胞在体内增殖(复发),但此时机体自身的特异性免疫力强劲,足以抵抗肿瘤的复发;18周指示瘤细胞在体内再次逐渐消亡;21-28周指示瘤细胞在体内再次增殖(复发),但此时机体自身的特异性免疫力强劲,足以抵抗肿瘤的复发;32-35周指示瘤细胞在体内再次逐渐消亡;42-48周指示瘤细胞在体内再次增殖,但此时机体自身的特异性免疫力强劲,足以抵抗肿瘤的复发,但此次瘤细胞在体内再次增殖的程度较前两次强;60-78周指示瘤细胞在体内再次逐渐消亡;85周指示瘤细胞在体内会再次增殖,且程度较前三次更强。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0021] 实施例1:小鼠肥大细胞瘤(动态)诊断试剂盒的制备

[0022] 1. 试剂盒的成分组成:抗原、酶标二抗、ELISPOT抗体组合(包括抗细胞因子一抗、生物素标记的二抗和酶标亲和素)、阳性和阴性对照血清、洗涤液、样品稀释液、底物溶液、终止液、WEST-BLOT专用化学发光试剂(分A和B两种)和X-光胶片。

[0023] 2. 制备方法:

[0024] (1) 抗原的制备方法:收集小鼠肥大细胞瘤细胞若干,经PBS洗涤2次后,加适量PBS重新悬浮细胞,超声波裂解细胞,5000RPM离心10分钟,去除细胞碎片,上清液进一步经密度梯度离心,收集分子量大小在30~100kDa范围内的蛋白质,测定蛋白浓度,以不低于1mg/ml为合格,即为备用抗原。然后按摸好的标准条件包被ELISA专用板,条件为:ELISA板的抗原包被浓度为20 μ g/ml;用于ELISPOT细胞培养板的合适刺激抗原的浓度为20~50 μ g/ml。

[0025] (2) 辣根过氧化物酶(HRP)酶标二抗、ELISPOT抗体组合:直接从大公司批量购买,比如:可从Millipore购买如下抗体,Rat anti-Mouse Interleukin 4(IL-4)ELISPOT Antibody Pair (Catalogue#:ELI-004-M);Rat anti-Mouse IFN γ ELISPOT Antibody Pair(Catalogue#:ELI-016-M);Rat anti-mouse IgG1 HRP conjugated monoclonal antibody(Catalogue#:CBL1001H);可从Santa Cruz Biotechnology, Inc. 购买Goat anti-mouse IgG2a HRP(Catalogue #:sc-2061);Goat anti-mouse IgG1 HRP(Catalogue#:sc-2060)。以上抗体经适当稀释后分装成与试剂盒相匹配的小包装(1000 \times)。

[0026] (3) 阳性和阴性对照血清的制备:

[0027] (A) 阳性对照血清的制备:收集小鼠肥大细胞瘤培养细胞,经适当辐射光照,使其失去增殖能力,按5000细胞/小鼠免疫小鼠;2周后二免,50,000细胞/小鼠;4周后三免,1000,000细胞/小鼠;6周后用活细胞进行攻击,500,000细胞/小鼠;9~10周,少量采血,测定抗体效价,ELISA效价高于1:100,000时,放血,收集血清,然后抗体经适当稀释,分装成与试剂盒相匹配的小包装(1000 \times)。

[0028] (B) 阴性对照血清的制备:选择从未与小鼠肥大细胞瘤细胞接触过的同源阴性小鼠,首先少量采血,测定抗小鼠肥大细胞瘤抗体效价,确定抗体效价100%阴性的小鼠,然后,放血,收集血清,不稀释,仅分装成与试剂盒相匹配的小包装。

[0029] (4) 洗涤液:10×浓缩洗涤液,含有 Tween-20 的 PBS(PBST) (PBS 为现有技术中的通用配方,组成如下:每升 10×PBST:NaCl 80g, KCl2g, KH₂PO₄ 2.4g, Na₂HPO₄ 14.4g, pH 7.4, Tween-20 5ml)。

[0030] (5) 样品稀释液:10×样品稀释液,含有牛血清白蛋白(BSA)的 PBS,其中,BSA 的含量为 5%。

[0031] (6) 底物溶液:

[0032] (A)ELISA 中 HRP 最常用的色原底物有邻苯二胺(OPD)和四甲基联苯胺(TMB),其专用底物溶液配制如下:

[0033] OPD 类:显色底物溶液:在 0.1mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH5.0)中含 20mmol/L OPD 和 12mmol/L H₂O₂,或 10mmol/L OPD 和 5.5mmol/L H₂O₂。测定波长:492nm。

[0034] TMB 类:显色底物溶液:先将 TMB 以 0.1mol/L 的浓度溶于二甲亚砜,然后再将其以 1mmol/L 和 H₂O₂ 以 3.0mmol/L 的浓度溶于 0.2mol/L 醋酸钠/枸橼酸缓冲液(pH4.0),即可应用。测定波长:450nm。

[0035] (B)ELISPOT 专用底物主要有 AEC Chromogen 和 BCIP-NBT,其专用底物溶液配制如下:

[0036] AEC Chromogen 类:对于 1 块 ELISPOT 板,200ul AEC Chromogen+10ml AEC Substrate,混匀,100 μl/孔,10 分钟内用完。

[0037] BCIP-NBT 类:BCIP-NBT 为片剂,内含 NBT(Nitro blue tetrazolium)和 BCIP(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)底物以及完整的 Buffer 盐成分。使用时将 1 粒 BCIP/NBT 片直接溶于 40ml 蒸馏水,即形成完全符合碱性磷酸酶显色条件的底物反应溶液,pH 9.5。

[0038] (7) 终止液:ELISA 专用终止液为 2M 硫酸;ELISPOT 直接用清水冲洗终止即可。

[0039] (8)WEST-BLOT 专用化学发光试剂(分 A 和 B 两种)和 X-光胶片:直接从大公司批量购买,分装。如 Millipore 的化学发光试剂:Visualizer™ Western Blot Detection Kit, mouse (Included Goat Anti-Mouse IgG, HRP conjugate;Visualizer™ Detection Reagent B and Visualizer™ Detection Reagent A. Catalogue#:64-201);Denville Scientific Inc. 的 X-光胶片:Hyblot CL Film(Catalogue#:E3012)。

[0040] 3. 使用方法:

[0041] (1) 测定抗体或抗体亚类:可选用标准 ELISA 或 WEST-BLOT 测定方法。

[0042] (2) 测定细胞因子:应用标准 ELISPOT 测定方法。

[0043] 实施例 2:应用实施例 1 所制备的试剂盒,通过测定不同种类的细胞因子和/或抗体亚类对癌症进行动态(或早期)诊断的标准确定。

[0044] 取小鼠 50 只,随机分成两组,实验组 30 只,对照组 20 只。实验组小鼠先用适当肿瘤疫苗进行免疫,2 周后采血样测定其免疫反应情况,选择处于免疫保护状态的小鼠 20 只作肿瘤攻击实验。用高剂量肿瘤细胞攻击免疫小鼠和对照小鼠,以使对照小鼠 100%长肿瘤,而免疫小鼠基本 100%保护为合适剂量。高剂量肿瘤细胞攻击后两周,采血样,溶解红细胞,洗涤并计数白细胞,进而用其测定特异性 γ-干扰素和白细胞介素-4 水平。方法为 ELISPOT 测定法,简明操作如下:

[0045] 1. 无菌操作,96 孔 ELISPOT 测定板一块,将 2 μg/ml 捕获抗体(抗鼠 γ-干扰素

或白细胞介素-4)加入5ml PBS中,混合,每孔加50ul,盖上板盖,4℃过夜。

[0046] 2. 无菌操作,倒去液体,PBST洗涤3次。

[0047] 3. 每孔加入100ul细胞培养液,盖上板盖,室温下孵育2小时。

[0048] 4. 倒去液体,每孔加入100ul细胞悬浮液(含适当量的细胞,每孔 $0.1 \sim 1 \times 10^6$ 个血液白细胞,和相应浓度的刺激原, $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 纯化的瘤细胞抗原)。盖上盖,37℃ CO₂孵育箱中孵育一定的时间(15~20小时)。这期间不要晃动或移动孔板。

[0049] 5. 以下步骤不需无菌操作。倒去液体,在水槽边和吸水纸上轻轻拍打细胞板,以去掉多余的水分。

[0050] 6. 用ddH₂O洗涤3次,以裂解细胞,每次让细胞在ddH₂O中停留5分钟。

[0051] 7. PBST洗涤3次,并将板子吸干。

[0052] 8. 将 $2 \mu\text{g/ml}$ 检测抗体(生物素标记的抗鼠 γ -干扰素或白细胞介素-4)加入5ml PBS中,混合,每孔加50ul,盖上板盖,室温孵育2小时。

[0053] 9. PBST洗涤4次,并将板子吸干。

[0054] 10. 每板以5ml PBS-1% BSA稀释5ul的亲合素碱性磷酸酶。每孔加入50ul此液体,盖上板盖,室温孵育2小时。

[0055] 11. PBST洗涤4次,ddH₂O洗涤2次,并将板子吸干。

[0056] 12. 每孔加入100ul BCIP/NBT。

[0057] 13. 在暗处室温下反应5-15分钟。完全显色后,将此液倒于相应的盘中,然后,直接用水冲洗板子以终止反应。此板在空气中自然干燥,室温下避光保存。

[0058] 另外,高剂量肿瘤细胞攻击后每周采血样一次,分离血清,测定特异性抗体亚类IgG1和IgG2a,持续4周。方法为标准间接ELISA或WEST-BLOT测定方法。其简明操作方法如下:

[0059] 1) 简明间接ELISA测定方法

[0060] (1) 将纯化的特异性肿瘤抗原用PBS稀释至 $20 \mu\text{g/ml}$,以 $50 \mu\text{l}$ /孔的量加入96孔ELISA板中,4℃过夜。

[0061] (2) PBS或PBST洗涤3次, $200 \mu\text{l}$ /孔。

[0062] (3) 以 $200 \mu\text{l}$ /孔5%的脱脂奶粉PBS室温封闭2小时。

[0063] (4) 加入以PBS递倍稀释的受检血清(包括阳性及阴性对照血清), $100 \mu\text{l}$ /孔,室温孵育2小时或4℃过夜。

[0064] (5) PBS或PBST洗涤3次, $200 \mu\text{l}$ /孔。

[0065] (6) 以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入经5%的脱脂奶粉PBS稀释的HRP酶标抗鼠IgG1或IgG2a抗体,室温孵育2小时。

[0066] (7) PBS或PBST洗涤3次, $200 \mu\text{l}$ /孔。

[0067] (8) 以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入底物溶液显色(详见实施例1)。

[0068] (9) 以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入2M硫酸终止反应。

[0069] (10) 读取结果(详见实施例1)。

[0070] 2) 简明间接WEST-BLOT测定方法

[0071] (1) 将纯化的特异性肿瘤抗原用PBS稀释至 $200 \mu\text{g/ml}$,以 $300 \mu\text{l}$ /胶的量加入小型10% SDS-PAGE变性胶上,常规电泳,然后,将胶上蛋白转印至硝酸纤维素膜上。

[0072] (2) 以 5% 的脱脂奶粉 PBS 室温封闭硝酸纤维素膜 2 小时。

[0073] (3) 以 5% 的脱脂奶粉 PBS 稀释血清, 分别加入到有 20 条杂交孔道的 WEST-BLOT 专用杂交板中, 4°C 摇动过夜。

[0074] (4) PBST 洗膜 6 次, 10 分钟 / 次。

[0075] (5) 以 5% 的脱脂奶粉 PBS 稀释的 HRP 酶标抗鼠 IgG1 或 IgG2a 抗体, 室温孵育膜 2 小时。

[0076] (6) PBST 洗膜 6 次, 10 分钟 / 次。

[0077] (7) 将化学发光试剂 A 和 B 等比例混合 (如各取 3ml) 均匀, 将膜蛋白面朝下, 充分与试剂接触约 1 分钟, 将膜移至另一保鲜膜上, 去尽残液, 包好, 放入 X-光片夹中, 在暗室中曝光、显影 (详见实施例 1)。

[0078] (8) 凝胶图象分析: 将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

[0079] 实验结果见表 1 和图 1 和图 2。由表 1 可知, 免疫小鼠特异性 γ -干扰素 / 白细胞介素-4 (IFN- γ / IL-4) 的值均大于 1, 而未免疫小鼠特异性 γ -干扰素 / 白细胞介素-4 (IFN- γ / IL-4) 的值均小于 1。根据此标准, 当小鼠 (或人) 体内有肿瘤生长时, 若特异性 IFN- γ / IL-4 的值大于 1, 则表明机体处于抗肿瘤免疫状态, 即朝康复方向发展 (预后良好); 否则, 若特异性 IFN- γ / IL-4 的值小于 1, 则表明机体处于促肿瘤生长免疫状态, 即朝恶化方向发展 (预后不良)。由图 1 和图 2 可知, 免疫小鼠攻击肿瘤细胞后, 不长肿瘤, 1-4 周内 IgG1 水平在可测定水平以外, 判为阴性; 但 IgG2a 水平很高, 定为康复标志。未免疫小鼠攻击肿瘤细胞后, 长肿瘤, 1-4 周内 IgG2a 水平在可测定水平以外, 判为阴性; 但 IgG1 水平很高, 定为恶化标志 (IgG1)。因此, 根据 IgG1 和 IgG2a 的发展变化, 即可预测肿瘤的发展方向 (预后), 亦即, 当 IgG1 水平明显高于 IgG2a 时, 肿瘤向恶化方向发展; 反之, 当 IgG2a 水平明显高于 IgG1 时, 肿瘤向康复方向发展。如果不考虑抗体亚类, 只测定有无针对某一肿瘤抗原的特异性抗体存在, 即可用于肿瘤的早期诊断。

[0080] 表 1: 不同免疫状态下的小鼠攻击肿瘤后产生特异性抗肿瘤细胞因子能力的变化
[0081]

	γ -干扰素/白细胞介素-4 (IFN- γ /IL-4)
免疫小鼠 (20 只)	5.8, 6.9, 8.7, 12.9, 15.8, 16.8, 21.1, 25.8, 26.6, 28.8, 33.6, 36.8, 45.6, 48.9, 52.6, 55.8, 63.5, 66.8, 68.9, 75.9
未免疫小鼠 (20 只)	0.002, 0.005, 0.012, 0.028, 0.035, 0.046, 0.058, 0.066, 0.078, 0.089, 0.118, 0.151, 0.168, 0.238, 0.325, 0.438, 0.426, 0.536, 0.596, 0.668

[0082] 实施例 3: 应用实施例 1 所制备的试剂盒和实施例 2 所制定的诊断标准, 对小鼠癌症进行动态诊断的实例

[0083] 取小鼠 30 只, 随机分成两组, 实验组 20 只, 对照组 10 只。实验前采血, 保留血清备用。给实验组小鼠皮内 (i. d.) 接种适量肿瘤细胞, 约 2 周左右, 待肿瘤长到直径 3mm 左右时, 施以外科手术切除肿瘤, 并于手术后间隔适当时间采血, 分离血清, 测定特异性抗体

亚类 IgG1 和 IgG2a, 方法为间接 ELISA 或 WEST-BLOT 测定方法 (详见实施例 2), 持续 85 周后结束。

[0084] 实验结果见图 3。由图可知, -2 周时 IgG1 与 IgG2a 均为阴性, 指示在肿瘤接种前抗体呈阴性反应。手术后 1 周时 IgG1 很强, 但 IgG2a 很弱, 说明手术时肿瘤在向恶性方向发展 (抗体反应有滞后性)。手术后 2-8 周时 IgG1 基本消失, IgG2a 则逐渐有增强迹象, 指示瘤细胞在体内逐渐消亡, 免疫反应也由促肿瘤生长免疫状态转向抗肿瘤免疫状态 ;10-15 周时 Ig2a 突然变的非常强壮, 指示残留瘤细胞在体内增殖 (复发), 刺激机体产生较强的特异性抗肿瘤免疫反应, 足以抵抗肿瘤的复发 ;18 周时 IgG1 和 IgG2a 均显示阴性, 指示瘤细胞在体内再次逐渐消亡 ;21-28 周时 Ig2a 再次突然变的非常强壮, 指示瘤细胞在体内再次增殖 (复发), 但此时机体自身的特异性免疫力强劲, 足以抵抗肿瘤的复发 ;32-35 周时 IgG2a 逐渐变弱, 但 IgG1 仍为阴性, 指示瘤细胞在体内再次逐渐消亡 ;42-48 周时 Ig2a 又一次突然变的非常强壮, 同时, IgG1 也有较弱的反应, 指示瘤细胞在体内再次增殖, 但此时机体自身的特异性免疫力仍强劲, 足以抵抗肿瘤的复发, 但此次瘤细胞在体内再次增殖的程度较前两次强 ;60-78 周时 IgG2a 逐渐变弱, IgG1 由阳性转为阴性, 指示瘤细胞在体内又一次逐渐消亡 ;85 周时, IgG1 转为阳性, 但 IgG2a 此时为阴性, 指示小鼠抗肿瘤免疫力下降, 瘤细胞在体内会再次增殖, 且程度较前三次更强, 最终小鼠会死于复发性癌症。

[0085] 实施例 4 : 小鼠抗结核病免疫 (动态) 诊断试剂盒的制备

[0086] 1. 试剂盒的成分组成 : 抗原、酶标二抗、ELISPOT 抗体组合 (包括抗细胞因子一抗、生物素标记的二抗和酶标亲和素)、阳性和阴性对照血清、洗涤液、样品稀释液、底物溶液、终止液、WEST-BLOT 专用化学发光试剂 (分 A 和 B 两种) 和 X- 光胶片等。

[0087] 2. 制备方法 :

[0088] (1) 抗原的制备方法 : 收集悬浮培养的 BCG 结核菌若干, 经 PBS 洗涤 2 次后, 加适量 PBS 重新悬浮细胞, 超声波裂解细胞, 5000RPM 离心 10 分钟, 去除细胞碎片, 上清液进一步经密度梯度离心, 收集分子量大小在 30 ~ 100kDa 范围内的蛋白质, 测定蛋白浓度, 以不低于 100 μ g/ml 为合格, 即为备用抗原。然后按摸好的标准条件包被 ELISA 专用版, 本实验中 ELISA 板的抗原包被浓度为 100ng/ml ; 用于 ELISPOT 细胞培养板的合适刺激抗原的浓度为 100 ~ 200ng/ml。

[0089] (2) 辣根过氧化物酶 (HRP) 酶标二抗、抗细胞因子一抗和 HRP 或 AP (碱性磷酸酶) 酶标抗细胞因子二抗 : 直接从大公司批量购买, 经适当稀释后分装成与试剂盒相匹配的小包装 (1000 \times)。 (详见实施例 1)。

[0090] (3) 洗涤液 : 10 \times 浓缩洗涤液, 含有 Tween-20 的 PBS (PBST), 其中 Tween-20 的量为 0.5%。

[0091] (4) 样品稀释液 : 10 \times 样品稀释液, 含有牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS, 其中 BSA 的含量为 5%。

[0092] (5) 底物溶液 : 详见实施例 1。

[0093] (6) 终止液 : ELISA 专用终止液为 2M 硫酸 ; ELISPOT 直接用水冲洗终止即可。

[0094] 3 使用方法 :

[0095] (1) 测定抗体或抗体亚类 : 可选用标准 ELISA 或 WEST-BLOT 测定方法。

[0096] (2) 测定细胞因子 : 应用标准 ELISPOT 测定方法。

[0097] 实施例 5 :应用实施例 4 所制备的试剂盒对小鼠抗结核病免疫保护状态进行诊断

[0098] 与小鼠抗肿瘤免疫保护反应类似。给实验小鼠分别于皮下 (s. c.) 或静脉 (i. v.) 接种 10^1 、 10^2 、 10^5 、 10^7 和 10^9 CFU 等不同剂量的卡介苗 (BCG), 接种后 12 ~ 16 周用高剂量重组 BCG 攻击 (i. v. 接种), 而后, 10 ~ 12 周, 分别测定特异性细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的量 (方法为 ELISPOT 测定法, 详见实施例 2), 以及特异性抗体亚类 IgG1 和 IgG2a 的量 (方法为间接 ELISA 或 WEST-BLOT 测定方法, 详见实施例 2), 并取小鼠脾脏分离重组 BCG, 简明方法: 研磨、过滤、离心, 取适量单细胞悬浮液铺到琼脂版上, 置入 37°C 培养箱中培养约 3 周, 计数每个平板上菌落数量。结果表明, 当特异性细胞因子 IFN- γ /IL-4 和 / 或 IgG2a/IgG1 的比率越大时, 分离到的重组 BCG 的菌落数量越小。诊断标准: 当特异性细胞因子 IFN- γ /IL-4 和 / 或 IgG2a/IgG1 的比率大于 1 时, 具有较好的免疫保护力, 比率越大, 免疫保护力越强; 反之, 当特异性细胞因子 IFN- γ /IL-4 和 / 或 IgG2a/IgG1 的比率小于 1 时, 免疫保护力较弱, 比率越小, 免疫保护力也越弱。

[0099] 实施例 6 :小鼠抗慢性利什曼病免疫 (动态) 诊断试剂盒的制备

[0100] 1. 试剂盒的成分组成: 抗原、酶标二抗、ELISPOT 抗体组合 (包括抗细胞因子一抗、生物素标记的二抗和酶标亲和素)、阳性和阴性对照血清、洗涤液、样品稀释液、底物溶液、终止液、WEST-BLOT 专用化学发光试剂 (分 A 和 B 两种) 和 X- 光胶片等。

[0101] 2. 制备方法:

[0102] (1) 抗原的制备方法: 收集利什曼虫体若干, 经 PBS 洗涤 2 次后, 加适量 PBS 重新悬浮细胞, 超声波裂解细胞, 5000RPM 离心 10 分钟, 去除细胞碎片, 上清液进一步经密度梯度离心, 收集分子量大小在 30 ~ 100kDa 范围内的蛋白质, 测定蛋白浓度, 以不低于 100 μ g/ml 为合格, 即为备用抗原。然后按摸好的标准条件包被 ELISA 专用版, 本实验中 ELISA 板的抗原包被浓度为 500ng/ml; 用于 ELISPOT 细胞培养板的合适刺激抗原的浓度为 500 ~ 800ng/ml。

[0103] (2) 辣根过氧化物酶 (HRP) 酶标二抗、抗细胞因子一抗和 HRP 或 AP (碱性磷酸酶) 酶标抗细胞因子二抗: 直接从大公司批量购买, 经适当稀释后分装成与试剂盒相匹配的小包装 (1000 \times)。 (详见实施例 1)。

[0104] (3) 洗涤液: 10 \times 浓缩洗涤液, 含有 Tween-20 的 PBS (PBST), 其中 Tween-20 的量为 0.5%。

[0105] (4) 样品稀释液: 10 \times 样品稀释液, 含有牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS, 其中 BSA 的含量为 5%。

[0106] (5) 底物溶液: 详见实施例 1。

[0107] (6) 终止液: ELISA 专用终止液为 2M 硫酸; ELISPOT 直接用水冲洗终止即可。

[0108] 3 使用方法:

[0109] (1) 测定抗体或抗体亚类: 可选用标准 ELISA 或 WEST-BLOT 测定方法。

[0110] (2) 测定细胞因子: 应用标准 ELISPOT 测定方法。

[0111] 实施例 7 :应用实施例 6 所制备的试剂盒对小鼠抗慢性利什曼病免疫保护状态进行诊断

[0112] 与小鼠抗结核病免疫保护试验类似。给实验小鼠分别于后肢足垫皮下 (s. c.) 接种高、低不同剂量的利什曼寄生虫。每 2 周观察一次病变, 最长观察约 2 年, 并间隔不同时

间,分别测定特异性细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的量(方法为 ELISPOT 测定法,详见实施例 2),以及特异性抗体亚类 IgG1 和 IgG2a 的量(方法为间接 ELISA 或 WEST-BLOT 测定方法,详见实施例 2),并取小鼠足垫和淋巴结分离寄生虫。结果表明,当特异性细胞因子 IFN- γ / IL-4 和 / 或 IgG2a/IgG1 的比率越大时,分离到的寄生虫数量越小或消失。诊断标准:当特异性细胞因子 IFN- γ / IL-4 和 / 或 IgG2a/IgG1 的比率大于 1 时,具有较好的免疫保护力,比率越大,免疫保护力越强,较轻临床症状或无临床症状;反之,当特异性细胞因子 IFN- γ / IL-4 和 / 或 IgG2a/IgG1 的比率小于 1 时,免疫保护力较弱,比率越小,免疫保护力也逐渐丧失,临床症状也越严重。

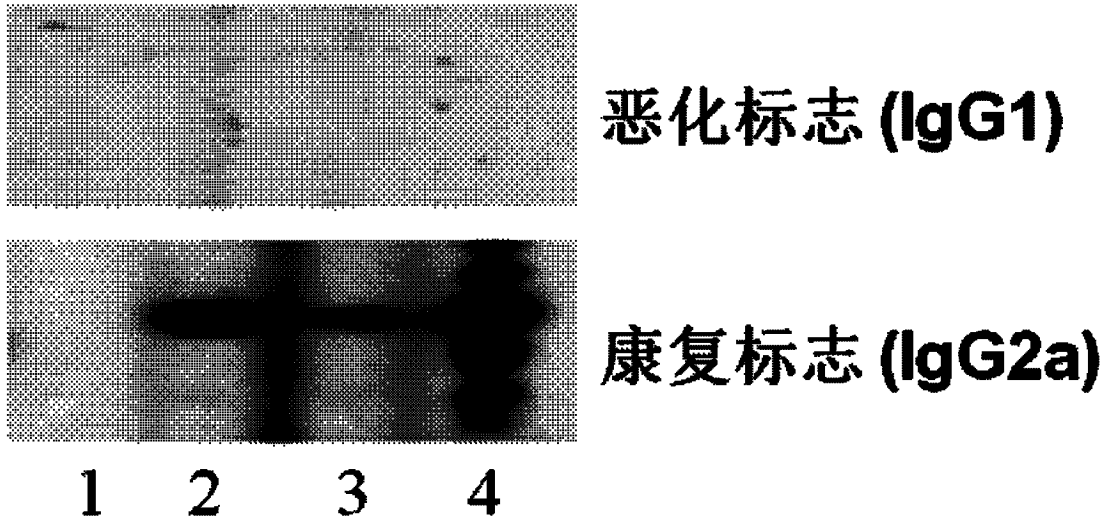


图 1

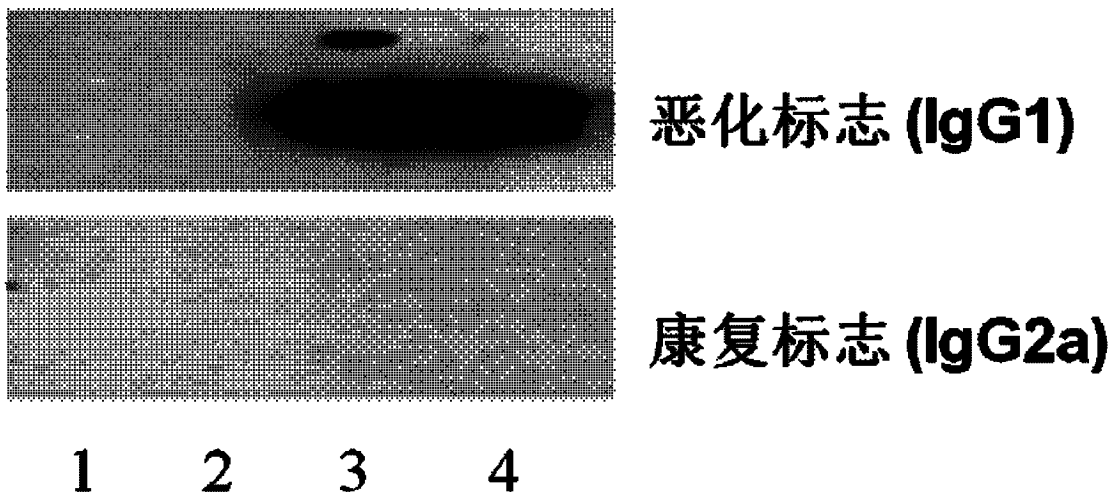


图 2

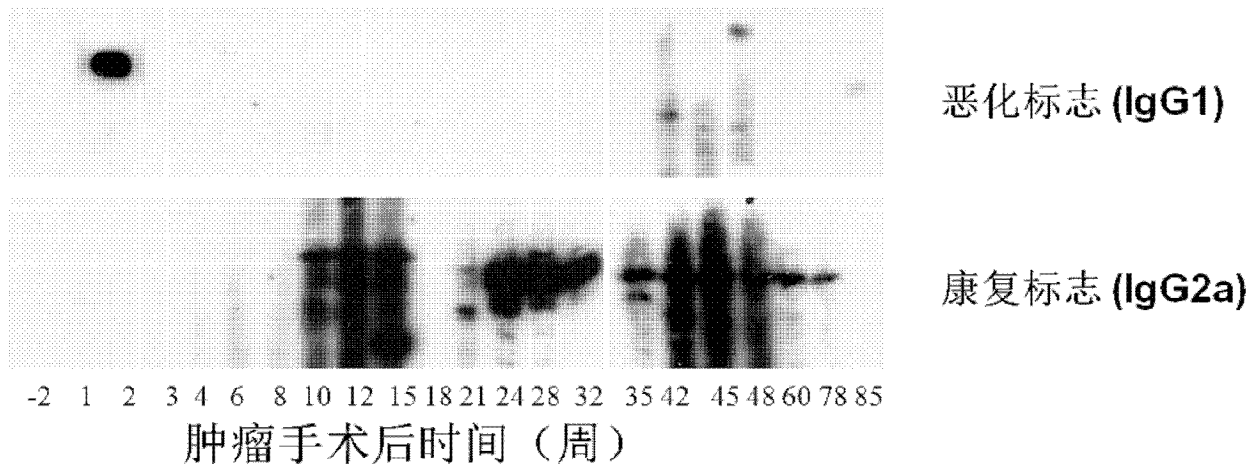
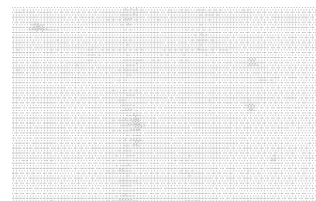


图 3

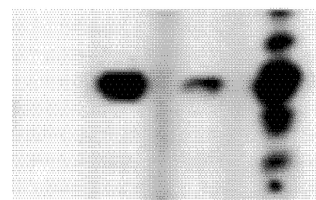
专利名称(译)	一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒		
公开(公告)号	CN102279257B	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	CN201110174898.0	申请日	2011-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	刘永庆		
申请(专利权)人(译)	刘永庆		
当前申请(专利权)人(译)	刘永庆		
发明人	刘永庆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	杨琪		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102279257A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于诊断人或动物的免疫相关性疾病的试剂盒，包括抗体或细胞因子，抗体的抗原或细胞因子的刺激原，以及组成试剂盒所必需的其他反应试剂；所述抗体为两种或两种以上的具有区分不同免疫反应类型功能的抗体或亚类抗体，所述细胞因子为两种或两种以上的具有区分不同免疫反应类型功能的细胞因子。本发明以特有的生物标志作为诊断指标，不但可达到诊断的目的，而且可达到区分一类和二类等不同免疫反应类型的目的。这种诊断的重要意义在于：诊断指标同时还可指明疾病发展的程度，并且能够根据指标在治疗过程中的动态变化，正确指导临床医生及时调整治疗方案，达到恰到好处的治疗，并对预后做出正确的判断。



恶化标志 (IgG1)



康复标志 (IgG2a)

1 2 3 4