###

发布

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

蛋白质致敏性细胞学评价技术规范

**Technical specifications of protein allergenicity in vitrobased on cellular assay**

（征求意见稿）



发布

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

中国国家标准化管理委员会

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

蛋白质致敏性细胞学评价技术规范

1 范围

本标准规定了以嗜碱性粒细胞活化试验对蛋白质致敏性评价的方法，包括仪器和设备，试剂和材料，分析步骤及结果计算。

本标准适用于蛋白质的细胞致敏性测定，包括β-氨基己糖苷酶释放率、半最大效应浓度。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

β-氨基己糖苷酶释放率β-hexosaminidase release rate

蛋白质与处于活化状态的RBL-2H3细胞结合后，会使其产生脱颗粒效应从而导致β－氨基己糖苷酶的释放，上清液中β－氨基己糖苷酶含量与细胞内总的β－氨基己糖苷酶含量的比值表示β-氨基己糖苷酶释放率。

3.2

半最大效应浓度concentration for 50% of maximal effect,EC50

指β-氨基己糖苷酶最大释放率的一半时对应的蛋白质浓度。

4 原理

嗜碱性粒细胞RBL-2H3细胞表面含有大量高亲和力IgE受体，当处于被IgE活化状态时，RBL-2H3细胞与蛋白质结合后，会引起细胞膜稳定性下降，产生脱颗粒效应，从而在胞外释放出β－氨基己糖苷酶等生物活性物质，通过测定β－氨基己糖苷酶释放率和半最大效应浓度可以评价蛋白质致敏程度。

5 仪器和设备

5.1 离心机：相对离心力≥1000×g

5.2 微量移液器：规格2.5μL，20μL，200 μL，1 mL

5.3 恒温水浴锅：精度0.1℃

5.4 二氧化碳细胞培养箱：精度0.1℃

5.5 电子分析天平：精度0.1mg

5.6 酶标仪: 检测波长405 nm

6 试剂和材料

使用分析纯试剂和符合GB/T 6682 规定的二级水，除非另有说明。

6.1 小鼠IgE抗体

6.2 10 mmol/L磷酸盐缓冲液，pH7.2（，）

称取80 g NaCl，2 g KCl，2 g KH2PO4，36.2 g Na2HPO4·12H2O，溶于超纯水，全部溶解后，定容至1000 mL，充分混匀后，调pH至7.2，0.22μm微孔滤膜滤过除菌，4 ℃保存备用或购买同类商品化产品。

6.3 嗜碱性粒细胞系：RBL-2H3 (ATCC CRL-2256)

6.4 MEM细胞培养基

取5%终体积的水加入到1L烧杯中，将MEM干粉培养基倒入烧杯，水洗包装袋内面两次，倒入烧杯中，磁力搅拌助溶，随后加入2.2 g NaHCO3，2.383gHEPES。加水定容至1000mL，用HCl或者NaOH调节pH至7.2，0.22μm微孔滤膜滤过除菌，4 ℃保存备用或购买同类商品化产品。临用前加10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素/链霉素。

6.5 PNAG溶液

称取3.68 g Na2HPO4·12H2O，0.933 g柠檬酸，溶解后加入34.2 g 4-nitrophenylNacetyl-p-D-glucosaminide（PNAG），加超纯水定容至100 mL，即为1 mmol/L PNAG溶液。

6.6 Na2CO3终止液

称取5g Na2CO3，加水定容至118 mL，避光保存。

6.7 台氏液（Tyrode’s）

准确称取8.0gNaCl, 0.2gKCl, 0.26g MgSO4**.**7H2O, 0.065g NaH2PO4**.**2H2O, 1.0g NaHCO3, 0.2g CaCl2和1.0g葡萄糖，加水定容至1000 mL，充分混匀后，调pH至7.2，0.2μm微孔滤膜滤过除菌，4 ℃保存备用或购买同类商品化产品。

7 分析步骤

7.1 细胞培养

将RBL-2H3细胞，置于75cm2培养瓶中，加入10mL含10% FBS的MEM培养液，于37℃，5%CO2培养箱中培养48h。

7.2 细胞接种

在倒置显微镜下观察培养瓶中细胞生长情况，当细胞长满（达80-90%）时，弃去培养液，向瓶内加入2.0 mL 胰蛋白酶液，在倒置显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆，迅速拿回操作台，弃去胰蛋白酶液，向瓶内加入10mL 含10% FBS的MEM培养液，用血球计数板计数，使得细胞以1×105/mL（200 μL/孔）接种到96孔细胞培养板上，37℃，5%CO2培养箱中培养24h使其贴壁。

7.3 细胞活化

弃去上述96孔细胞培养板上的细胞培养液，用pH7.2的PBS缓冲液200 μL/孔洗涤，洗涤三次后，加入100 μL /孔含IgE抗体（浓度为50 μg/mL）的MEM培养液，在37℃，5%CO2培养箱培养箱中培养24 h。

7.4 细胞与蛋白激发

7.4.1 样品组：弃去上述培养液，用pH7.2的PBS缓冲液200 μL/孔洗涤，洗涤3次，洗液全部吸净后，各组依次加入不同稀释度的待测蛋白(0.05 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 1 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL)。上述蛋白溶液均用Tyrode's缓冲液稀释，50 μL/孔，在37℃，5%CO2培养箱反应45 min。反应结束后，放入冰盒中终止反应。

7.4.2 全部释放组：弃去上述培养液，用pH7.2的PBS缓冲液200 μL/孔洗涤，洗涤3次，洗液全部吸净后，加入50 μL/孔1% Trition X-100裂解液，轻轻吹打使得裂解液和RBL-2H3细胞充分接触，置于4℃反应45min后，吸取培养上清，1000×g离心5 min, 收集上清液。

7.4.3 空白对照组：弃去上述培养液，用pH7.2的PBS缓冲液200 μL/孔洗涤，洗涤3次，洗液全部吸净后，用50 μL/孔Tyrode's缓冲液代替蛋白处理细胞，在37℃，5%CO2培养箱反应45 min。

7.5 β-氨基己糖苷酶含量测定

将作用后的反应液，按30 μL/孔上清液转移至96孔板，加入 50 μLPNAG溶液，37℃反应1h后，加200 μL碳酸钠终止液终止反应，用酶标仪在波长 405 nm 处测各孔吸光度值。样品组的吸光度标记为C1，空白对照组的吸光度标记为C0，全部释放组标记为Cm。

8 结果计算

8.1 β-氨基己糖苷酶释放率

按照式（1）计算：

………………………………….（1）

式中：

*r*——释放率（%）；

C1——样品组吸光度；

C0——空白对照组吸光度；

Cm——全部释放组吸光度。

8.2 半最大效应浓度（EC50）

以蛋白质浓度值为横坐标，以β-氨基己糖苷酶释放率为纵坐标，拟合标准曲线，计算β-氨基己糖苷酶最大释放率为一半时对应的蛋白浓度，即为半最大效应浓度（EC50）。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对值差值不得超过算数平均值的10%。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_