



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102636650 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 15

(21) 申请号 201210079402. 6

(22) 申请日 2012. 03. 23

(71) 申请人 沃克(天津)生物科技有限公司

地址 300384 天津市南开区华苑产业园区榕  
苑路 16 号鑫茂科技园 A 座 IJ 单元 6 层  
右侧

(72) 发明人 李会强 常艳敏 李迺昶 任杰  
孙辉

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有  
限公司 12103

代理人 董光仁

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

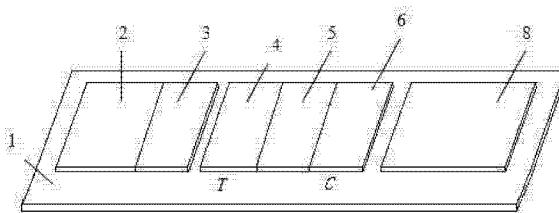
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

牛奶过敏原检测板及其制备方法

(57) 摘要

本技术发明公开一种牛奶过敏原检测板，属  
于金免疫层析检测。本发明在 PVC 垫板上两端分  
别设置待测样本区和吸附区，而在其间依次设置  
有分别将酪蛋白， $\beta$  乳球蛋白， $\alpha$  乳白蛋白标记  
胶体金，混合制备的胶体金标记抗原，在硝酸纤维  
素膜上分别包被混合牛奶过敏原的检测区和包被  
抗- $\beta$  乳球蛋白抗体的质控区。检测时，标本中含  
有牛奶特异性抗体，形成免疫复合物则检测区和  
质控区形成显色线；如标本中不含有牛奶特异性  
抗体，则检测区不显色，只有质控区一条显色线。  
这样设计的本发明具有过敏原检测针对性强、操  
作简单、成本低、敏感度高等优点，防止单类抗体  
检测的漏诊现象。应用于疑似牛奶过敏患者的快  
速筛查，特别适合基层医疗单位使用。



1. 一种牛奶过敏原检测板的制备方法,包括矩形 PVC 垫板(1)上两端分别设置吸水材料的待测样本区(1)和吸附区(8),其特征在于:待测样本区(1)和吸附区(8)中间依次设置有胶体金标记抗原(3),在硝酸纤维素膜(5)上分别包被牛奶中酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白组成牛奶过敏原(4)的检测区 T 和包被抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体(6)的质控区 C,

其中,在经膜处理液浸泡过的硝酸纤维素膜(5)上,将牛奶过敏原 4 和抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体(6),按照顺序分别点样于规划的检测区 T 和质控区 C, 牛奶过敏原(4)的总蛋白浓度和抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体(6)总蛋白浓度均为 1.8-2.2 毫克 / 毫升,一次点样,每个点样孔 0.2 毫升,室温温育 2 小时;蒸馏水及膜处理液冲洗后,用 2% 聚乙烯醇溶液室温封闭 1 小时;弃去封闭液,蒸馏水、膜处理液冲洗,干燥后裁剪置于 PVC 垫板 1 上;

另将酪蛋白,  $\beta$  乳球蛋白,  $\alpha$  乳白蛋白分别标记胶体金,混合制备胶体金标记抗原 3,并置于 PVC 垫板 1 上。

2. 根据权利要求 1 所述牛奶过敏原检测板的制备方法,其特征在于:牛奶过敏原 4 是牛奶中酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白等浓度比例混合后作为已知抗原点样。

3. 根据权利要求 1 所述牛奶过敏原检测板的制备方法,其特征在于:胶体金标记抗原 3 的制备方法是:每 50 ml 胶体金溶液分别加入 0.6 ml 1mg/ml 的酪蛋白溶液、0.8 ml 1mg/ml 的  $\beta$  乳球蛋白溶液、0.5 ml 1mg/ml 的  $\alpha$  乳白蛋白溶液,搅拌后再分别加入 3 ml 1% 聚乙二醇溶液,离心去上清,分别用 0.3 mg/ml 的聚乙二醇溶液悬浮沉淀,离心后,再用同样溶液悬浮,测定  $A_{520nm}$  至 1.45-1.55,加入终浓度为 0.5 mg/ml 叠氮钠防腐,分别标记后等体积混合,4°C 静置保存,备用。

4. 根据权利要求 1 所述牛奶过敏原检测板,包括矩形 PVC 垫板(1)上两端分别设置吸水材料的待测样本区(2)和吸附区(8),其特征在于:待测样本区(1)和吸附区(8)中间依次设置有胶体金标记抗原(3)、在硝酸纤维素膜(5)上分别包被牛奶过敏原(4)的检测区 T 和包被抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体(6)的质控区 C。

## 牛奶过敏原检测板及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及双抗原夹心金免疫层析检测技术,具体是一种牛奶过敏原检测板及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 过敏性疾病是指机体对外界刺激(食物、药物、花粉等)作出错误免疫应答导致各种临床症。免疫应答是抗原活化免疫细胞后产生机体复杂反应过程;引起过敏反应的抗原(蛋白)称之为过敏原。食物过敏性疾病是由于进食某种食物导致过敏性肠胃炎或皮肤症状,有时可导致严重的全身反应-过敏性休克。牛奶是婴幼儿甚至成人的重要营养来源,而对牛奶过敏的患者饮用牛奶会产生肠胃不适症状,影响儿童健康发育。牛奶过敏在食物过敏人群中占有相当大的比例,成人大约2%,儿童约占6%。研究证实,食物过敏患者的临床症状是因患者体内产生的特异性抗体(IgE或IgG)所致;同时也可以通过检测血清中是否存在此种特异性抗体,来帮助临床医生确认过敏性食物。

[0003] 目前,国内用于过敏原检测的商品化试剂主要为免疫印迹法和酶联免疫法。由于引起过敏反应的抗体主要是IgE类,因此,这些商品化试剂测定的抗体多为IgE类。

[0004] 此外,为了在一次检测过程中,能检测到多种过敏原抗体以实现多种过敏原联合筛查,这些商品化试剂盒已经预先在固相材料表面(硝酸纤维膜的不同区域或酶标反应板不同孔)包被多种过敏原。由于过敏性疾病有明显地域性,商品化试剂可针对不同地区特点有不同过敏原组合模式。同时,根据过敏原进入人体途径又分为主要针对空气中过敏原的吸入性过敏原检测试剂盒;以及针对食物中过敏原的食入性过敏原检测试剂盒。

[0005] 但是,上述商品化试剂盒在进行食入性过敏原筛查时存在一定缺陷或不足,主要表现为以下几个方面:

(1) 食物过敏存在某些特殊性,临床医生往往根据患者或家属提供的病史作出初步判断,可以锁定一种或几种食物认为是疑似过敏食物。在这种情况下,实验室只需检测疑似食物,而不需检测其它食物。但是,目前商品化试剂盒却不能根据临床医生的提示进行选择,只能按照商品化试剂盒所提供的固定组合方式进行检测。此种测定模式不仅增加患者就医成本,而且,也浪费宝贵医学资源。

[0006] (2) 研究显示食物过敏反应并非均由IgE类抗体导致,部分病例由IgG<sub>4</sub>引起;同时,有些个体对食物过敏原应答后可产生IgG类抗体,从而导致食物不耐受。由于现有商品化试剂盒采用间接法模式检测特异性IgE,采用羊(兔)抗人IgE作为标记抗体,此种诊断试剂不能检测到IgG类抗体,容易漏诊,影响临床作出正确诊断。

[0007] (3) 无论是酶联免疫法,还是酶免疫印迹法,由于复杂操作过程和较长反应时间,使整个检测过程一般需要3-4小时。如此长的检测时间,使患者不能在初次就医时拿到检测报告,患者需要择日取报告,再次就医。对于初诊患儿如医生怀疑牛奶过敏,往往需要快速实验室诊断,此时只需快速筛查进行排除或初步确认,而现有商品化试剂盒不能满足临床或患者的这一要求。

## 发明内容

[0008] 本发明就是为了解决食入性过敏原筛查过程中,不能根据临床医生的提示进行选择,只能按照商品化试剂盒所提供的固定组合方式进行检测,不能检测到 IgG 类抗体,容易漏诊,以及酶免疫印迹法,复杂操作过程和较长反应时间等问题,而提供一种快速的牛奶过敏原检测板及其制备方法。

[0009] 本发明是按以下技术方案实现的。

[0010] 一种牛奶过敏原检测板的制备方法,包括矩形 PVC 垫板上两端分别设置吸水材料的待测样本区和吸附区,而在待测样本区和吸附区中间依次设置有胶体金标记抗原,在硝酸纤维素膜上分别包被牛奶中酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白组成牛奶过敏原的检测区和包被抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体的质控区,

其中,在经膜处理液浸泡过的硝酸纤维素膜上,将牛奶过敏原和抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体 6,按照顺序分别点样于规划的检测区和质控区,牛奶过敏原的总蛋白浓度和抗 - $\beta$  乳球蛋白总蛋白浓度均为 1.8-2.2 毫克 / 毫升,一次点样,每个点样孔 0.2 毫升,室温温育 2 小时;蒸馏水及膜处理液冲洗后,用 2% 聚乙烯醇溶液室温封闭 1 小时;弃去封闭液,蒸馏水、膜处理液冲洗,干燥后裁剪置于 PVC 垫板上;

另将酪蛋白,  $\beta$  乳球蛋白,  $\alpha$  乳白蛋白分别标记胶体金,混合制备胶体金标记抗原,并置于 PVC 垫板上。

[0011] 所述牛奶过敏原检测板的制备方法,其牛奶过敏原是牛奶中酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白等浓度比例混合后作为已知抗原点样。

[0012] 所述牛奶过敏原检测板的制备方法,其胶体金标记抗原的制备方法是:每 50 ml 胶体金溶液分别加入 0.6 ml 1mg/ml 的酪蛋白溶液、0.8 ml 1mg/ml 的  $\beta$  乳球蛋白溶液、0.5 ml 1mg/ml 的  $\alpha$  乳白蛋白溶液,搅拌后再分别加入 3 ml 1% 聚乙二醇溶液,离心去上清,分别用 0.3 mg/ml 的聚乙二醇溶液悬浮沉淀,离心后,再用同样溶液悬浮,测定  $A_{520nm}$  至 1.45-1.55,加入终浓度为 0.5 mg/ml 叠氮钠防腐,分别标记后等体积混合,4℃ 静置保存,备用。

[0013] 所述牛奶过敏原检测板,包括矩形 PVC 垫板上两端分别设置吸水材料的待测样本区和吸附区,而待测样本区和吸附区中间依次设置有胶体金标记抗原、在硝酸纤维素膜上分别包被牛奶过敏原的检测区和包被抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体的质控区。

[0014] 本发明使用时,取患者外周血并分离血清,将待检血清样本加在测试板的加样区

并发生层析。在层析过程中首先溶解胶体金标记过敏原,如果样本中含有牛奶抗体,样本中的牛奶抗体同胶体金标记抗原结合,形成抗体 - 过敏原 - 胶体金复合物,此复合物沿着测试板继续移动,首先到达预先包被过敏原的检测区 T,并被预先包被的过敏原捕获形成双抗原夹心复合物,复合物不断被富集并在检测区 T 形成一条紫红色的检测线。同时,过剩的金标记过敏原在层析至质控区 C,与预先包被在此区的抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体结合,同样形成一条紫红色的质控线。因此,检测区和质控区同时显色时为阳性结果。如果样本中不含有牛奶抗体,检测区 T 没有免疫复合物形成,不出现显色,而金标记过敏原在层析至质控区 C,仍与包被在此区的牛奶抗体结合,同样形成一条紫红色的质控线。因此,只在质控区 C 出现显色时为阴性结果。本技术发明的检测原理如附图 2 所示。

[0015] 本发明与目前临床应用食物过敏检测试剂盒相比，具有如下优势：

(1). 根据患者病史或临床医生提示，对疑似牛奶过敏患者进行单一过敏原筛查，为患者节约就医成本，为国家节约医学资源。

[0016] (2). 对患者血清中所有种类的 IgG 或 IgE 进行检测，不容易漏诊；同时双抗原夹心检测抗体，特异性更强。

[0017] (3). 简化了烦琐的常规操作过程，大大地缩短检测时间，10 分钟内完成检测；同时目测判断结果，无需仪器设备，结果直观可靠，适合于基层医疗单位。

## 附图说明

[0018] 图 1 是牛奶过敏原检测板结构示意图；

图 2 是牛奶过敏原检测板检测原理示意图。

[0019] 图中：

- |            |                       |
|------------|-----------------------|
| 1. PVC 垫板  | 2. 加样区                |
| 3. 胶体金标记抗原 | 4. 牛奶过敏原              |
| 5. 硝酸纤维素膜  | 6. 抗 - $\beta$ 乳球蛋白抗体 |
| 7. 待检标本    | 8. 吸附区                |
| → 表示层析流动方向 | Au. 胶体金颗粒。            |

## 具体实施方式

[0020] 下面结合附图及实施例对本发明进行详细的说明。

[0021] 1. 关键原料

(1) 牛奶过敏原：酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白 3 种过敏原纯品，均为商品化试剂，购自美国 Sigma 公司。

[0022] (2) 硝酸纤维素膜 (NC)：商品化材料，进口分装，购自碧云天 (Beyotime) 公司；

(3) 抗 - $\beta$  乳球蛋白抗体：购自 Abcam 公司。

[0023] (4) 胶体金颗粒：商品化试剂，购自上海浩然生物技术有限公司，进口原装，货号 G1527

2. 制备牛奶过敏原

据文献报道，牛奶中主要包括酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白 3 种过敏原组分，因此，本技术发明选取酪蛋白、 $\beta$  乳球蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白按等浓度比例混合作为已知抗原，用于包被硝酸纤维素膜的检测区 T。

[0024] 3. 制备胶体金标记牛奶过敏原

胶体金标记采用物理吸附法。胶体金颗粒对蛋白质的吸附作用取决于 pH 值。在 pH 值位于蛋白质等电点 (pI) 时，蛋白质溶解度最小，水化程度最小，最容易吸附到疏水的金颗粒表面。但在实际操作中，一般将标记缓冲液的 pH 值调到稍高于欲标记蛋白质的等电点，这样蛋白质带正电，与胶体金颗粒结合更稳定。采用 0.1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 或 0.1 M HCl 调节胶体金溶液的 pH 至选定值。

[0025] 选取牛奶中 3 种主要过敏原：酪蛋白， $\beta$  乳球蛋白， $\alpha$  乳白蛋白，因 3 种蛋白等电点各不相同，故采用分别标记方式。

[0026] (1) 酪蛋白标记方法：

A 用 0.1 M 盐酸调节胶体金溶液(直径 20 纳米) pH 值至 6.0。

[0027] B 取 50 ml 胶体金溶液加入 0.6 ml 酪蛋白溶液(酪蛋白 1mg/ 三蒸水 ml), 搅拌 3 分钟。

[0028] C 加入 3 ml 1% 聚乙二醇(分子量 20000) 溶液。

[0029] D 于 120000 rpm 离心 40 分钟, 用吸管小心吸去上清。

[0030] E 用 0.3 mg/ml 的聚乙二醇(分子量 20000) 溶液悬浮沉淀, 再次离心 120000 rpm 40 分钟, 再用同样溶液悬浮, 测定  $A_{520nm}$  至 1.5, 加入终浓度为 0.5 mg/ml 叠氮钠防腐, 置 4°C 保存备用。

[0031] (2)  $\beta$  乳球蛋白标记方法

A 用 0.1 M 盐酸调节胶体金溶液(直径 20 纳米) pH 值至 5.5。

[0032] B 取 50 ml 胶体金溶液加入 0.8 ml  $\beta$  乳球蛋白溶液( $\beta$  乳球蛋白 1mg/ 三蒸水 ml), 搅拌 3 分钟。

[0033] C 加入 3 ml 1% 聚乙二醇(分子量 20000) 溶液。

[0034] D 于 120000 rpm 离心 40 分钟, 用吸管小心吸去上清。

[0035] E 用 0.3 mg/ml 的聚乙二醇(分子量 20000) 溶液悬浮沉淀, 再次离心 120000 rpm 40 分钟, 再用同样溶液悬浮, 测定  $A_{520nm}$  至 1.5, 加入终浓度为 0.5 mg/ml 叠氮钠防腐, 置 4°C 保存备用。

[0036] (3)  $\alpha$  乳白蛋白标记方法

A 用 0.1 M 盐酸调节胶体金溶液(直径 20 纳米) pH 值至 5.0。

[0037] B 取 50 ml 胶体金溶液加入 0.5 ml  $\alpha$  乳白蛋白溶液( $\alpha$  乳白蛋白 1mg/ 三蒸水 ml), 搅拌 3 分钟。

[0038] C 加入 3 ml 1% 聚乙二醇(分子量 20000) 溶液。

[0039] D 于 120000 rpm 离心 40 分钟, 用吸管小心吸去上清。

[0040] E 用 0.3 mg/ml 的聚乙二醇(分子量 20000) 溶液悬浮沉淀, 再次离心 120000 rpm 40 分钟, 再用同样溶液悬浮, 测定  $A_{520nm}$  至 1.5, 加入终浓度为 0.5 mg/ml 叠氮钠防腐, 置 4°C 保存备用。

[0041] 以上三种标记物分别测试, 在按等体积混合作为胶体金标记过敏原。

[0042] 4. 制备硝酸纤维素膜 - 牛奶过敏原 T 或抗 -  $\beta$  乳球蛋白抗体 C

(1) 膜处理 取一张硝酸纤维素膜(7cm×8cm), 做标记后放在 pH 8.0 膜处理液(TBS) 中浸泡 5-10 分钟；

(2) 组装点样装置 将浸泡过的硝酸纤维素膜放在平铺的垫子上, 放上蛋白点样板子, 板子两侧的孔要在硝酸纤维膜上, 上面留出贴标记纸的地方, 用夹子固定；

(3) 点样 划分好检测区 T 和质控区 C, 将混合后的牛奶过敏原和抗 -  $\beta$  乳球蛋白抗体, 按照顺序分别点样于有一定距离的检测区 T 和质控区 C。牛奶过敏原总蛋白浓度为 2 毫克 / 毫升; 抗 -  $\beta$  乳球蛋白抗体浓度 2 毫克 / 毫升; 每个点样孔 0.2 毫升; 以上均点样一次, 室温温育 2 小时；

(4) 封闭 取出硝酸纤维膜用蒸馏水冲洗三次, TBS 洗 10 分钟, 再用 2% 聚乙烯醇(PVA) 溶液(称取 2 克聚乙烯醇溶于 100 毫升蒸馏水) 室温封闭 1 小时；

(5) 漂洗 弃去封闭液,用蒸馏水冲洗三次, TBS 洗三次,每次 10 分钟;

(6) 风干 将 NC 膜放在干燥的纸上,自动干燥,贴标记纸,裁剪备用。

[0043] 5. 制备硝酸纤维膜处理液 (TBS)

双蒸水( ddH<sub>2</sub>O) 800 ml

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 6.055 g

叠氮钠(NaN<sub>3</sub>) 1 g

氯化钠(NaCl) 8.766 g

用 HCl 或 NaOH 调 pH 至 7.95~8.05, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1L。

[0044] 6. 牛奶过敏原快速筛查试剂盒组装

按附图 1 所示顺序进行牛奶过敏原检测板组装, 组装时胶体金标记抗原点样后需要真空干燥, 内置干燥剂后真空包装, 4℃保存。

[0045] 在矩形 PVC 垫板 1 上两端分别设置吸水材料的待测样本区 2 和吸附区 8, 而在待测样本区 1 和吸附区 8 中间依次设置有胶体金标记抗原 3、在硝酸纤维素膜 5 上分别包被牛奶过敏原 4 的检测区 T 和包被抗 -β 乳球蛋白抗体 6 的质控区 C。

[0046] 7. 使用本发明测定时, 只需将待检血清加在检测板一端加样区 2, 在层析作用下, 待检标本中的牛奶特异性抗体依次与胶体金标记抗原 3 和检测区 T 的包被牛奶过敏原 5 结合, 形成双抗原夹心复合物, 形成显色线; 同时, 胶体金标记抗原 3 又与质控区 C 包被抗 -β 乳球蛋白 6 结合, 形成免疫复合物而显色。如标本中不含有牛奶特异性抗体, 检测区 T 不显色, 只有质控区 C 一条显色线, 说明检测结果的有效性。

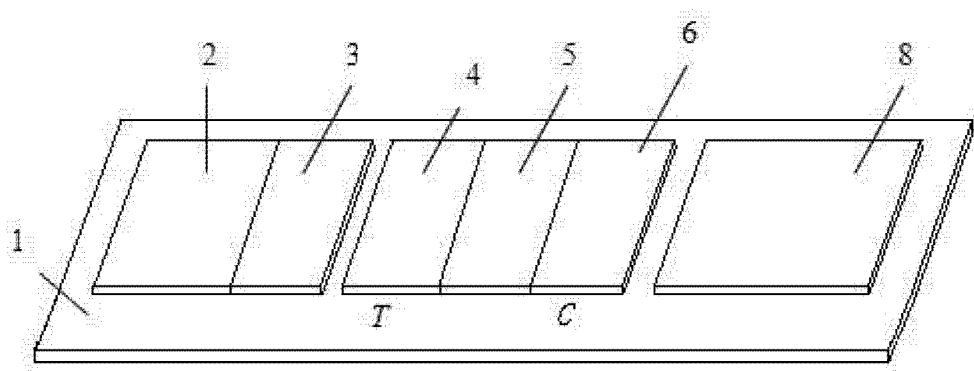


图 1

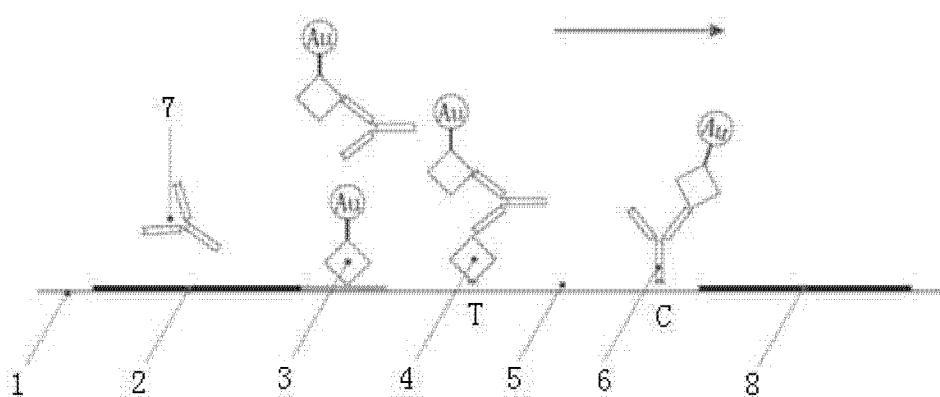


图 2