



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044326 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510573499. X

(22) 申请日 2015. 09. 11

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米园 C6 栋 101

(72) 发明人 郭海侠 杨万春 熊春光 彭会军
赵莉莉 李庆春

(74) 专利代理机构 苏州广正知识产权代理有限
公司 32234

代理人 赵红

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒及方法, 试剂盒包括膜条、多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体和与所述多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体相配的底物显色剂, 所述膜条上固定有 str-bio- 过敏原, 采用试剂盒对过敏原特异性 IgE 抗体进行检测。通过上述方式, 本发明可高灵敏地定性或半定量地快速检测人血清或血浆中的过敏原特异性抗体 IgE 浓度, 而且可以降低过敏原用量, 并可一次筛查数十种过敏原, 具有快速、准确、样品用量少的优点, 适宜进行高通量检测。



1. 一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒,其特征在于,包括膜条、多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体和与所述多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体相配的底物显色剂,所述膜条上固定有 str-bio- 过敏原。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述多聚酶为多聚碱性磷酸酶或多聚辣根过氧化物酶,所述抗人 IgE 抗体为羊抗人 IgE 抗体、兔抗人 IgE 抗体或鼠抗人 IgE 抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述膜条的制作过程为:(1)将过敏原溶解于磷酸盐缓冲液中得到第一溶液,将 Sulfo-NHS-Biotin 溶于水中得到第二溶液,将第一溶液和第二溶液混匀反应,并柱层析得到生物素化的过敏原溶液;(2)将链霉亲和素 Str 用抗原包被液溶解得到第三溶液,将生物化的过敏原溶液用抗原包被液溶解得到第四溶液,将第三溶液和第四溶液喷涂于膜条上;(3)将所述膜条干燥,再将干燥好的膜条和数字标签组装贴于胶片上,斩切得到膜条。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,步骤(1)中所述过敏原与所述磷酸盐缓冲液的比例为:2~10 mg:1 ml;计算所述第一溶液的毫摩尔数,计算方法为:蛋白质质量(mg)/蛋白分子量(MW)=蛋白质的毫摩尔数;当所述过敏原溶解于磷酸盐缓冲液前含有不恰当的缓冲液时,通过在磷酸盐缓冲液中透析或浓缩的方法除去;所述生物素和所述过敏原的投料摩尔比为 2~4:1;所述生物素化过敏原溶液中加入叠氮钠存放。

5. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,步骤(2)中所述第三溶液和第四溶液的喷涂采用 BIODOT AD1510 芯片点样仪进行,所述芯片点样仪的第一通道吸取第三溶液,第二通道吸取第四溶液,第一通道先划线,第二通道再划线,第一通道的喷量为 0.5ul/cm,第二通道的喷量为 1ul/cm,喷涂在硝酸纤维素膜上。

6. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,步骤(3)中将所述膜条在湿度为 40%~60% 的恒湿箱中放置 15min 后于 37℃ 下干燥 12~16 小时,将干燥好的膜条和数字标签按组装模板贴在透明胶片上,将贴好的膜条使用数字感应斩切机按 1.88mm 斩切,将切好的膜条放入装有干燥剂的铝箔自封袋中并封口。

7. 一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的检测方法,其特征在于,包括步骤为:(1)样品缓冲液加入置有膜条的孵育槽中,再将所述样品缓冲液吸掉;(2)稀释后的血清样品加入孵育槽中孵育后吸掉,再加入清洗缓冲液进行洗涤;(3)吸去所述孵育槽中液体,加入酶结合物孵育;(4)再加入稀释后的血清样品孵育后吸掉;(5)加入底物液孵育并吸掉后再加入水洗涤;(6)取出膜条干燥后进行检测。

8. 根据权利要求 7 所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述膜条是带有文字标记的一面朝上放置,加入所述样品缓冲液晃动 5 分钟后吸掉;步骤(2)中加入血清样品晃动孵育 30 分钟后吸掉;步骤(2)中加入所述清洗缓冲液晃动 5 分钟后吸掉,重复洗涤 2 次;步骤(3)中加入稀释后的酶结合物晃动孵育 30 分钟;步骤(4)中加入血清样品晃动孵育 30 分钟后吸掉;步骤(5)中加入底物液晃动孵育 10 分钟;步骤(5)中所述水为蒸馏水或纯化水,加入水晃动 1 分钟,重复洗涤 2 次;步骤(6)中对所述膜条用 Reader 读值并记录测试结果。

9. 根据权利要求 7 所述的检测方法,其特征在于,在所述膜条置于孵育槽的过程中要防止膜条干燥;用夹具夹取所述膜条;在检测过程中防止交叉污染。

高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高灵敏的定性或半定量地筛查或检测人血清或血浆中的多个过敏原特异性 IgE 抗体水平的检测试剂盒,及其制作方法和检测方法。

背景技术

[0002] 2011 ~ 2012 年世界变态反应组织(WAO)关于变态反应(也称过敏反应, Allergy)的白皮书中指出:“过敏性疾病的流行在发达国家和发展中国家全世界范围内正戏剧性地上升。过敏性疾病包括过敏性哮喘、过敏性鼻炎、严重过敏反应,药物、食物及昆虫过敏反应,湿疹、荨麻疹(枯草热)和血管性水肿等。过去二十年尤其是儿童患过敏性疾病人数的增加有暴发的趋势。”仅食物引发的过敏性疾病的流行率就达 3% ~ 6%。过敏性疾病是患者吸入或摄食入含有致敏成分的物质(称为过敏原或变应原, Allergen)后触发机体的 B 细胞产生过量的免疫球蛋白 E (Immunoglobulin E, IgE),当 IgE 抗体在体内再次接触过敏原时就与过敏原交联结合到肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面上的高亲和受体 $Fc\epsilon R1$ 上,导致 $Fc\epsilon R1$ 受体的聚集,使肥大细胞和嗜碱性粒细胞活化。肥大细胞在活化过程中脱颗粒并释放储存在细胞浆颗粒里的炎性介质:组胺,与通过花生四烯酸途径合成的白三烯、免疫反应性前列腺素和 IL4、IL5 等细胞因子及趋化因子,引发过敏反应的疾病症状。过敏性疾病的发生, IgE 抗体起关键作用,称为 IgE 介导的过敏反应(即 Gell-Coombs I 型超敏反应,或称 IgE 介导的速发性超敏反应)。IgE 介导的过敏性疾病的特征是患者体内循环血液中的过敏原特异性 IgE (sIgE) 抗体浓度较正常状况下高,且病症越严重, sIgE 抗体浓度越高。过敏性疾病的临床诊断在美国临床医师实用指南中指出,根据患者病史结合点刺或血液检测过敏原特异性 IgE (sIgE) 抗体浓度,筛查致病过敏原。目前,检测血液中过敏原特异性 IgE (sIgE) 抗体浓度,筛查致病过敏原的方法有酶免疫法 (EIA)、免疫印迹法 (Immunoblotting Assay)、胶体金侧流层析法 (LFA)、蛋白芯片法 (Proteins microarray) 等,发展趋势并符合市场要求的是:自动化、快速、准确、样品用量少,一次筛查几十种过敏原。市场上产品不少,其中,瑞典 Pharmacia 公司产品 ImmunoCAP250 系统是酶免疫法的代表, ImmunoCAP Rapid 是胶体金侧流层析法的代表, ImmunoCAP ISAC 是蛋白芯片法的代表,开创了过敏原分子诊断;而德国 Mediwiss-analytic 公司的 AllergyScreen 则是免疫印迹法的代表 (Immunoblot for analysing specific IgE in human serum)。因人血液中 IgE 抗体平均浓度 ~ 0.005ug/ml,是总免疫球蛋白平均浓度的 0.002%, sIgE 抗体浓度更低,为满足自动化、快速、准确、样品用量少、一次筛查几十种过敏原、半定量或定量检测样品中的过敏原特异性 IgE (sIgE) 抗体浓度的要求,必须配置光电信号放大的检测仪,或生物化学方法的信号放大系统。如,瑞典 Pharmacia 公司产品 ImmunoCAP Rapid 一次只能筛查十来种过敏原,不配阅读仪,肉眼判读 sIgE 抗体浓度的灵敏度只有 1.0IU/ml (1IU IgE=2.44ng IgE),用 1.49IU/ml 区分阴性和阳性结果。

发明内容

[0003] 本发明主要解决的技术问题是提供了一种试剂盒及方法,是使用生物反应放大系统即生物素-亲和素系统来提高过敏原检测灵敏度并利用 Biodot 芯片点样仪双通道同时包被方法来提高过敏原的包被效率,降低了过敏原的包被浓度而且使过敏原与抗体结合位点更充分暴露,从而高灵敏地检测过敏原特异性抗体 IgE,用以定性或半定量地快速检测人血清或血浆中的过敏原特异性抗体 IgE 浓度,并可一次筛查数十种过敏原。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒,包括膜条、多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体和与所述多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体相配的底物显色剂,所述膜条上固定有 str-bio- 过敏原。

[0005] 在本发明一个较佳实施例中,所述多聚酶为多聚碱性磷酸酶或多聚辣根过氧化物酶,所述抗人 IgE 抗体为羊抗人 IgE 抗体、兔抗人 IgE 抗体或鼠抗人 IgE 抗体。

[0006] 在本发明一个较佳实施例中,所述膜条的制作过程为:(1)将过敏原溶解于磷酸盐缓冲液中得到第一溶液,将 Sulfo-NHS-Biotin 溶于水中得到第二溶液,将第一溶液和第二溶液混匀反应,并柱层析得到生物素化的过敏原溶液;(2)将链霉亲和素 Str 用抗原包被液溶解得到第三溶液,将生物化的过敏原溶液用抗原包被液溶解得到第四溶液,将第三溶液和第四溶液喷涂于膜条上;(3)将所述膜条干燥,再将干燥好的膜条和数字标签组装贴于胶片上,斩切得到膜条。

[0007] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)中所述过敏原与所述磷酸盐缓冲液的比例为:2~10 mg:1 ml;计算所述第一溶液的毫摩尔数,计算方法为:蛋白质质量(mg)/蛋白分子量(MW)=蛋白质的毫摩尔数;当所述过敏原溶解于磷酸盐缓冲液前含有不恰当的缓冲液时,通过在磷酸盐缓冲液中透析或浓缩的方法除去;所述生物素和所述过敏原的投料摩尔比为 2~4:1;所述生物素化过敏原溶液中加入叠氮钠存放。

[0008] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(2)中所述第三溶液和第四溶液的喷涂采用 BIODOT AD1510 芯片点样仪进行,所述芯片点样仪的第一通道吸取第三溶液,第二通道吸取第四溶液,第一通道先划线,第二通道再划线,第一通道的喷量为 0.5ul/cm,第二通道的喷量为 1ul/cm,喷涂在硝酸纤维素膜上。

[0009] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(3)中将所述膜条在湿度为 40%~60% 的恒湿箱中放置 15min 后于 37℃ 下干燥 12~16 小时,将干燥好的膜条和数字标签按组装模板贴在透明胶片上,将贴好的膜条使用数字感应斩切机按 1.88mm 斩切,将切好的膜条放入装有干燥剂的铝箔自封袋中并封口。

[0010] 提供一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的检测方法,包括步骤为:(1)样品缓冲液加入置有膜条的孵育槽中,再将所述样品缓冲液吸掉;(2)稀释后的血清样品加入孵育槽中孵育后吸掉,再加入清洗缓冲液进行洗涤;(3)吸去所述孵育槽中液体,加入酶结合物孵育;(4)再加入稀释后的血清样品孵育后吸掉;(5)加入底物液孵育并吸掉后再加入水洗涤;(6)取出膜条干燥后进行检测。

[0011] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)中所述膜条是带有文字标记的一面朝上放置,加入所述样品缓冲液晃动 5 分钟后吸掉;步骤(2)中加入血清样品晃动孵育 30 分钟后吸掉;步骤(2)中加入所述清洗缓冲液晃动 5 分钟后吸掉,重复洗涤 2 次;步骤(3)中加入稀释后的酶结合物晃动孵育 30 分钟;步骤(4)中加入血清样品晃动孵育 30 分钟后吸掉;步骤(5)中加入底物液晃动孵育 10 分钟;步骤(5)中所述水为蒸馏水或纯化水,加入水晃动 1

分钟,重复洗涤 2 次;步骤(6)中对所述膜条用 Reader 读值并记录测试结果。

[0012] 在本发明一个较佳实施例中,在所述膜条置于孵育槽的过程中要防止膜条干燥;用夹具夹取所述膜条;在检测过程中防止交叉污染。

[0013] 本发明的有益效果是:本发明的高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒及方法,可高灵敏地定性或半定量地快速检测人血清或血浆中的过敏原特异性抗体 IgE 浓度,而且可以降低过敏原用量,并可一次筛查数十种过敏原,具有快速、准确、样品用量少的优点,适宜进行高通量检测。

附图说明

[0014] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图,其中:

图 1 是本发明的高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒中膜条一较佳实施例的结构示意图。

具体实施方式

[0015] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0016] 实施例一:

提供一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的试剂盒,包括膜条、多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体和与所述多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体相配的底物显色剂。所述膜条为固化有 str-bio- 过敏原的纤维材料膜。所述多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体可市购获得,使用时用 pH 值为 7.4 的含体积分数为 0.05% 的 Triton X-100 的 PBS 配制成浓度 1:100 ~ 10000 的工作液。与所述多聚酶偶联的抗人 IgE 抗体对应的底物显色剂可市购获得,也可自行配制。所述抗人 IgE 抗体为羊抗人 IgE 抗体、兔抗人 IgE 抗体或鼠抗人 IgE 抗体,所述多聚酶为多聚碱性磷酸酶或多聚辣根过氧化物酶。上述为试剂的主要成分,不包含检测所用的常规试剂如稀释液、洗涤液等。

[0017] 所述膜条的制作过程为:

一、生物素化过敏原制备

(1) 将 2~10 mg 过敏原溶解于 1 ml 的磷酸盐缓冲液中得到第一溶液,所述磷酸盐缓冲液中含有 100 mM 磷酸盐、150 mM NaCl, pH 值为 7.2。计算第一溶液溶解的毫摩尔数,计算方法为:蛋白质质量(mg)/蛋白质分子量(MW)=蛋白质的毫摩尔数。如果过敏原中含有不恰当的缓冲液,如 Tris 或者甘氨酸,可以通过在 PBS 中透析或浓缩的方法除去。

[0018] 过敏原可以选为大豆过敏原,是将 10 mg 大豆过敏原溶解于 1 ml 的磷酸盐缓冲液中,计算方法为:大豆的质量(10mg)/大豆的分子量(MW:10KD)=大豆的毫摩尔数(0.001mmol)。

[0019] (2)在打开之前,平衡生物素至室温。加 2 mg Sulfo-NHS-Biotin 于 100 ul 超纯水中得到第二溶液。

[0020] (3)把第二溶液缓慢加入到第一溶液中,混匀,室温磁力搅拌反应 30 分钟得到第三溶液,其中所述生物素和所述过敏原的摩尔比为 2:1。

[0021] (4)把反应完全的第三溶液上 G25 柱,用磷酸盐缓冲液洗脱,收集得到生物素化的过敏原溶液,其中所述磷酸盐缓冲液中含有 100 mM 磷酸盐、150 mM NaCl, pH 值为 7.2。

[0022] (5)以 280 nm 的吸收值测定蛋白含量,大豆过敏原的蛋白含量为 5mg/ml。

[0023] (6)生物素化的蛋白即生物素化的大豆过敏原溶液于 4℃ 下存放至使用,可加入质量含量为 0.05% 的叠氮钠。

[0024] 二、Str-Bio- 过敏原抗原膜条制备

(1)将链霉亲和素 Str 用抗原包被液溶解至 0.5mg/ml 得到第四溶液,所述抗原包被液中含有 100 mM 磷酸盐、150 mM NaCl、质量分数为 10% 的蔗糖, pH 值为 7.2。

[0025] (2)把生物素化的大豆过敏原溶液用抗原包被液溶解至 1mg/ml 得到第五溶液。

[0026] (3)用 BIODOT AD1510 芯片点样仪分别吸取第四溶液和第五溶液,所述芯片点样仪的第一通道吸取第四溶液,第二通道吸取第五溶液。划线时,第一通道先划,第二通道再划,第一通道的喷量为 0.5ul/cm,第二通道的喷量为 1ul/cm,喷涂在硝酸纤维素膜上。

[0027] (4)喷涂好的硝酸纤维素膜在湿度为 40%-60% 恒湿箱中放置 15min 后于 37℃ 下干燥 12-16 小时。采用大豆过敏原时干燥 12 小时。

[0028] (5)按照图 1 的形式组装成膜条。

[0029] 将干燥好的膜条和数字标签按组装模板贴在透明胶片上(如图 1 检测功能线(PC)糖类交叉反应因子(CCD)屋尘螨(D1) 粉尘螨(D2) 猫皮屑(E1) 狗皮屑(E5) 蛋清(F1) 牛奶(F2) 花生(F13) 大豆(F14) 小麦(F4) 榛子(F17) 胡萝卜(F31) 猕猴桃(F84) 牛肉(F27) 链格孢(M6) 艾蒿(W6) 车前草(W9) 常见白桦树(T3) 橄榄树花粉(T9) 灰末(T25) 禾本科组合(Gx)),将贴好的膜条,使用数字感应斩切机按 1.88mm 斩切。将切好的膜条放入装有干燥剂的铝箔自封袋中并封口。

[0030] 实施例二:

提供一种高灵敏多项联检过敏原特异性 IgE 抗体的检测方法,包括步骤为:

(1)将抗原膜条置于孵育槽中,请将带有文字标记的一面朝上;每槽加入 1ml 样品缓冲液(50mM PH 7.4 Tris 缓冲液)将膜条室温下摇摆摇床轻微晃动 5 分钟,其后将其吸掉。

[0031] (2)每槽加入 1ml 稀释血清样品(用样本稀释液对半稀释血清样本),室温下在摇摆摇床上轻微晃动孵育 30 分钟。

[0032] (3)吸去孵育槽中液体。然后,每槽加入 1ml 清洗缓冲液(0.05% 吐温 20, 50mM PH 7.4 Tris 缓冲液, 0.05% 叠氮钠),室温下在摇摆摇床上轻微晃动 5 分钟,吸去孵育槽中液体。再重复洗涤 2 次。

[0033] (4)吸去孵育槽中液体。每槽加入 1ml 酶结合物(0.1ug/ml 的鼠抗人 IgE (FC 片段) 抗体),室温下在摇摆摇床上轻微晃动孵育 30 分钟。

[0034] (5)重复步骤 3。

[0035] (6)吸去孵育槽中液体,每槽加入 1ml 底物液 NBT/BCIP(氯化硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯甲苯胺盐),室温下在摇摆摇床上轻微晃动孵育 10 分钟。

[0036] (7) 吸去孵育槽中液体。然后,每槽加入 1ml 蒸馏水或纯化水,室温下在摇摆摇床上轻微晃动 1 分钟,吸去孵育槽中液体。再重复洗涤 2 次。.

(8) 膜条干燥后,用 Reader 读数并记录测试结果。

[0037] 检测过程中要注意的:在抗原膜条孵育过程中,请勿使膜条干燥。请勿用手直接接触抗原膜条,请用镊子夹取膜条。完成血清孵育后,倾倒反应液时应注意避免交叉污染。在孵育过程中,请室温下在摇摆摇床上轻微晃动抗原膜条。请确认所有的抗原膜条和样本符合检测要求。

[0038] 测试结果见下表:

浓度(IU/mL)	级别	结果解释
< 0.35	0	没有检测到特定抗体
0.35-0.7	+	轻度过敏,通常无临床症状但具备一定敏感性
0.7-3.5	++	中度过敏,大量接触后通常会出现临床症状
3.5-17.5	+++	高度过敏,通常临床症状也会出现
17.5-50	++++	非常高度的过敏,通常具有临床症状
50-100	+++++	很高程度的过敏

按照本发明方法,根据操作步骤操作,就可方便地用肉眼定性或半定量地判读检测人血清或血浆中的多个过敏原特异性 IgE 抗体水平;使用带数据处理功能的判读仪,可定量地检测人血清或血浆中的多个过敏原特异性 IgE 抗体浓度。

[0039] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其它相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

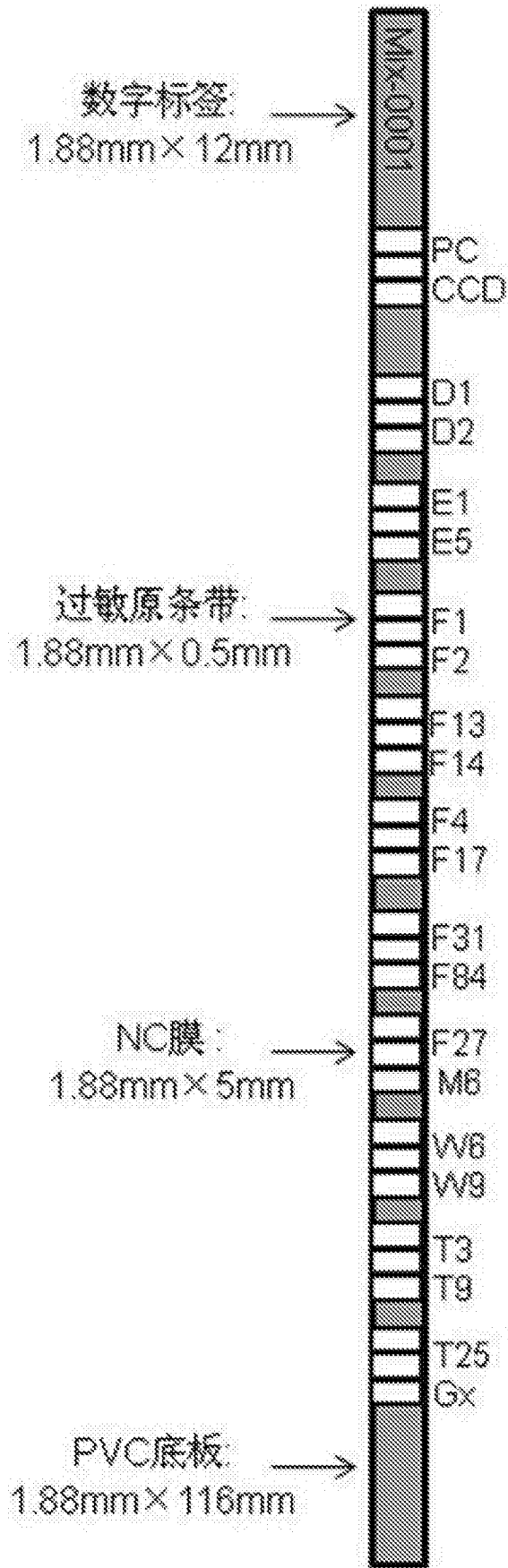


图 1