



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104820090 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201510246552. 5

(22) 申请日 2015. 05. 13

(71) 申请人 杭州傲敏生物科技有限公司

地址 310018 浙江省杭州市经济技术开发区
白杨街道经四支路 138 号 2A206、2A208

(72) 发明人 刘成安 周凯 刘斌 许晓元
陈美

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 朱莹莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书3页 说明书8页

(54) 发明名称

食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒及其
制备和检测方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及用于体外定量测定人血清中的针对食物过敏原特异性 IgE 抗体的含量的食物过敏原特异性 IgE 抗体(定量)检测试剂盒及其制备和检测方法。一种食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒,含有如下组分:磁分离试剂、过敏原试剂、酶反应物、校准品、质控品、浓缩清洗液以及底物液;所述磁分离试剂含有包被有抗人 IgE 抗体的磁微粒,所述过敏原试剂含有生物素标记的特异性过敏原。本发明食物过敏原特异性 IgE 抗体定量检测试剂盒,其检测方法为化学发光免疫分析技术和磁微粒分离技术相结合的一种检测方法,同时采用了酶免的捕获方法,具有操作方便、灵敏度高、准确性好、快速和无污染的特点。

1. 一种食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒, 含有如下组分: 磁分离试剂、过敏原试剂、酶反应物、校准品、质控品、浓缩清洗液以及底物液; 所述磁分离试剂含有包被有抗人 IgE 抗体的磁微粒, 所述过敏原试剂含有生物素标记的特异性过敏原。

2. 根据权利要求 1 所述的食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒, 其特征在于: 所述底物液包括 A 液和 B 液, A 液为硼砂、硼酸、鲁米诺和对碘苯酚的混合液, B 液为硼砂、硼酸、过氧化脲和 Proclin-300 的混合液。

3. 权利要求 1 或 2 所述的食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒的制备方法, 其特征在于: 包括如下步骤:

步骤一、磁分离试剂的制备

一、磁微粒缓冲液配制

(1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾, 6.81g/L NaCl, 0.5g/L Brij35 于 1L 容器中; (2)、量取 0.5-1ml Proclin-300 于 1L 容器中; 量取 800ml 纯化水于上述容器, 充分搅拌; (3)、调节 PH 值到 7.9-8.2 之间; (4)、称取 2g BSA 至上述 1L 容器中; (5)、最后定容至 1000ml, 0.22um 微孔滤器过滤; 做好标记于 2-8°C 冷库贮存;

二、磁分离试剂的制备

(1)、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中, 取 2mg 抗人 IgE 抗体溶于 PH 9.0-9.5 的 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液中至总体积为 1ml; (2)、确定辛二酸二琥珀酰亚胺酯的投入量, 用移液枪吸取辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到上述抗人 IgE 抗体溶液中, 置室温 90min; (3)、然后将抗体溶液加入到 Centricon-10 浓缩管中, 放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml; (4)、取 0.8ml 磁珠加入 5ml 反应杯中, 放入专用试管架, 经磁铁充分吸附约 5 分钟后移取掉上清; (5)、每次加入 2ml PH9.5 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次; 将获得的抗体溶液加入到上述磁珠中, 混匀后室温反应过夜; (6)、加入 0.3ml 1mol/L 的磷酸盐溶液 37°C 15 分钟; (7)、每次加入 1.5ml PH7.2 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液清洗已经标记的磁珠, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次; (8)、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶, 即为 0.05% 的 IgE 磁分离试剂; 磁珠保存液配方为 0.1% BSA, 0.05% Brij35, 0.02% NaN₃, 4°C 保存; (9)、将获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1:1 的比例混匀, 即得磁分离试剂;

步骤二、过敏原试剂的制备

一、过敏原稀释液的配置

(1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾, 6.81g/L NaCl, 0.5ml/L Brij35 于 1L 容器中; (2)、量取 0.5-1ml Proclin-300 于 1L 容器中; 量取 800ml 纯化水于上述容器, 充分搅拌; (3)、称取 0.5 ~ 1g 硫酸镁于 1L 容器中; (4) 调节 PH 值到 7.95-8.05 之间; (5)、称取 2g BSA 至上述 1L 容器中; (6) 称去 0.5 ~ 1g 明胶于上述 1L 容器 (6)、最后定容至 1000ml, 0.22um 微孔滤器过滤; 做好标记于 2-8°C 冷库贮存;

二、生物素偶联的过敏原的配置

将生物素标记的食物过敏原按照 0.1-1.0ug/ml 的浓度, 使用过敏原稀释液进行稀释;

步骤三、酶反应物的制备

一、酶反应物稀释液配置

(1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾于烧瓶中, 然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水, 充分搅拌

使试剂完全溶解；(2) 称取 0.5 ~ 1g 硫酸镁于 1L 容器中 (3)、调 PH, 控制在 7.0-7.2；(4)、称取 2g BSA 至上述烧瓶中；(5)、称取 0.5 ~ 1g 明胶于 1L 容器中；(6)、最后烧杯定容至 1000ml, 用 0.22um 微孔滤器过滤即得；

二、酶反应物的配置

按照 1:2000-1:5000 的稀释体积比例, 使用酶反应物稀释液对辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素进行稀释, 混合均匀即得酶反应物；

步骤四、校准品、质控品的制备

一、校准品、质控品稀释液的配置

(1)、称取称取 13.44g/L 磷酸氢二钾于 1L 的容器中, 定容至 1L；(2)、调节 pH 值至 7.0-7.2；(3) 用量筒量取小牛血清 300ml, 加入上述溶液中, 即为校准品稀释液, 2-8℃ 储存备用；

二、校准品、质控品的配置

校准品的浓度为 0、0.35、0.7、3.5、17.5、100KU/L, 质控品的浓度分别为 0.35、17.5KU/L, 使用校准品、质控品稀释液按照以上浓度进行稀释, 校准品、质控品所含物质为纯化的人 IgE 抗体；

步骤五、浓缩清洗液的配制

(1)、称取 KCl 4g、NaCl 40g、蔗糖 10g 于 1L 容器中；(2)、称取 0.225g Tween-20 于 100ml 容器中加 15ml 水使其完全溶解后, 倒入上述 1L 容器中；(3)、量取 Proclin-3000.225ml 至上述 1L 容器中；(4)、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中, 充分搅拌直至完全溶解；(5)、调 PH 至 7.35-7.45 之间；(6)、最后定容至 1000ml, 完全溶解后用 0.22um 微孔滤器过滤即得；

步骤六、底物液的制备

一、底物 A 液的配置

(1)、称取硼砂 5.721g、硼酸 2.474g、鲁米诺 1.0g 和对碘苯酚 0.1mg 于 1L 烧杯中；(2)、用量筒量取 400ml 纯化水于 1L 烧杯中, 充分搅拌直至完全溶解, 调节 PH 值至 7.95-8.05 之间；(3)、用 0.22um 微孔滤器过滤, 收集滤液, 用纯化水定容至 500ml, 混匀后即得；

二、底物 B 液的配置

(1)、称取硼砂 5.721g、硼酸 2.474g、过氧化脲 0.1g 和 Proclin-300250ul 于 1L 烧杯中；(2)、用量筒量取 400ml 纯化水于 1L 烧杯中, 充分搅拌直至完全溶解, 调 PH 值至 7.95-8.05 之间；(3)、用 0.22um 微孔滤器过滤收集滤液, 用纯化水定容至 500ml, 混匀后即得。

4. 权利要求 1 或 2 所述的食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒的使用方法, 其特征在于: 包括如下步骤:

(1)、加入 50 μ l 磁分离试剂至化学发光反应管底；

(2)、加入 50 μ l 标准品、质控品、待检血清至化学发光反应管底；

(3)、用多功能均匀混合器轻轻振荡反应管 30s 后, 置 37℃ 恒温箱反应 15 分钟；

(4)、反应管放至磁分离器上, 确保每个管底都与分离器表面接触, 沉淀 2-3 分钟; 缓慢的倒转分离器倒出上清液, 用力在吸水纸上将反应管内的液体拍干, 以除去粘在反应管中的液滴；

(5)、浓缩清洗液用纯化水稀释 20 倍后, 加 300-500 μ l 稀释后的清洗液至每一反应管

中,置多功能均匀混合器上轻轻振荡混匀 30s ;

(6)、重复步骤 (4)、(5)、(4) 一遍 ;

(7)、加入 50 μ l 过敏原试剂至反应管底 ;

(8)、加入 50 μ l 酶反应物至反应管底 ;

(9)、用多管均匀混合器轻轻振荡反应管 30s 后,置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 15 分钟 ;

(10)、重复步骤 (4)、(5)、(6) 一遍 ;

(11)、加入 50 μ l 底物液 A 和 50 μ l 底物液 B 至反应管底手动混匀,或放置在多管均匀混合器上轻轻震荡 5-10s,迅速用准备好的发光检测仪进行检测 ;

(12)、根据校准品采用四参数拟合方式拟合一条曲线,通过曲线计算待检样本所含的食物过敏原特异性 IgE 抗体的浓度。

食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及用于体外定量测定人血清中的针对食物过敏原特异性 IgE 抗体的含量的食物过敏原特异性 IgE 抗体(定量)检测试剂盒及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 食物过敏原是指食物中能够引起机体免疫系统异常反应的成分。食物过敏原一般为相对分子量 10000 ~ 70000 的蛋白质或糖蛋白,可分为主要过敏原与次要过敏原,大多数过敏患者对主要过敏原敏感,其是过敏疾病的一种,可能成为某些严重过敏疾病的诱因,对食物过敏原检测与我们日常生活密切相关。

[0003] 食物过敏原是诱发过敏性哮喘、过敏性腹泻等过敏性疾病的重要变应原。近年研究证实食物过敏原与过敏性疾病关系密切,根据美国、新西兰和澳大利亚等许多国家的调查相继证实了食物过敏原在许多国家重要的过敏原之一。目前全球已有几百项研究证实了食物过敏原与腹泻等过敏性疾病之间的密切关系。

[0004] 食物过敏的诊断主要依赖免疫学检测。目前临床上有许多体内和体外的免疫学检测方法,包括变应原皮肤试验、血清食物过敏原特异性 IgE 测定等。食物过敏患者的血清特异性抗体水平增高。可通过 ELISA 或 RAST 方法检测食物过敏原特异性抗体。有临床意义的指标包括特异性 IgE、IgG 和 IgA 抗体。检测特异性抗体水平可以帮助确诊食物过敏原及其过敏程度,同时可作为临床疗效评价的指标。

[0005] 目前临床多采用的 ELISA 方法,由于其局限性,检测灵敏度和准确性远不如化学发光的方法,而且 ELISA 的非均相反应所带来的本底高特异性不好。

[0006] 过敏性疾病是指由变态反应机制引起的疾病。变态反应又称超敏反应,是免疫机体再次接触相同变应原时发生的反应过渡剧烈而引起生理功能紊乱和(或)组织损伤的病理免疫反应。变态反应性疾病(又称过敏性疾病)包括特应性皮炎、食物过敏、变应性鼻炎和过敏性哮喘等,其发病率日益增高,且病情逐趋复杂化。WHO 已将变态反应性疾病列为 21 世纪重点研究和防治的疾病。近年,随着免疫组化、分子生物学技术和临床新技术,如纤维支气管镜的开展,已对该病达成共识,即其属于过敏性炎症,在炎症区有大量炎症细胞(包括嗜酸粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞、嗜碱粒细胞等)浸润。该病的发病主要涉及过敏原、抗体、细胞、受体和介质 5 个环节。当过敏原激发后,在 15-20 分钟所发生的速发相反应主要与肥大细胞有关,而在激发后 4-24 小时所发生的迟发相反应则被认为有嗜酸粒细胞和嗜碱粒细胞参与。这两个时相的反应均依赖于 T 淋巴细胞,特别是辅助 T 细胞(TH)中的一个亚型 TH2。过敏原是引起过敏性炎症的原因,因此若能发现致敏变应原种类,则对防治过敏性疾病有重要意义。

发明内容

[0007] 为了解决以上问题,本发明提供一种灵敏度高、特异性强、操作简单的食物过敏原特异性 IgE 抗体定量检测试剂盒、制备及检测方法。

[0008] 一种食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒,含有如下组分:磁分离试剂、过敏原试剂、酶反应物、校准品、质控品、浓缩清洗液以及底物液;所述磁分离试剂含有包被有抗人 IgE 抗体的磁微粒,所述过敏原试剂含有生物素标记的特异性过敏原。

[0009] 其中,所述底物液包括 A 液和 B 液,A 液为硼砂、硼酸、鲁米诺和对碘苯酚的混合液,B 液为硼砂、硼酸、过氧化脲和 Proclin-300 的混合液。

[0010] 本发明还提供了食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒的制备方法,包括

[0011] 如下步骤:

[0012] 步骤一、磁分离试剂的制备

[0013] 一、磁微粒缓冲液配制

[0014] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾,6.81g/L NaCl,0.5g/L Brij35 于 1L 容器中;(2)、量取 0.5-1ml Proclin-300 于 1L 容器中;量取 800ml 纯化水于上述容器,充分搅拌;(3)、调节 PH 值到 7.9-8.2 之间;(4)、称取 2g BSA 至上述 1L 容器中;(5)、最后定容至 1000ml,0.22um 微孔滤器过滤;做好标记于 2-8℃ 冷库贮存;

[0015] 二、磁分离试剂的制备

[0016] (1)、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中,取 2mg 抗人 IgE 抗体溶于 PH 9.0-9.5 的 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液中至总体积为 1ml;(2)、确定辛二酸二琥珀酰亚胺酯的投入量,用移液枪吸取辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到上述抗人 IgE 抗体溶液中,置室温 90min;(3)、然后将抗体溶液加入到 Centricon-10 浓缩管中,放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml;(4)、取 0.8ml 磁珠加入 5ml 反应杯中,放入专用试管架,经磁铁充分吸附约 5 分钟后移取掉上清;(5)、每次加入 2ml PH9.5 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,混匀 30 秒,上架,去上清,重复操作 3 次;将获得的抗体溶液加入到上述磁珠中,混匀后室温反应过夜;(6)、加入 0.3ml 1mol/L 的磷酸盐溶液 37℃ 15 分钟;(7)、每次加入 1.5ml PH7.2 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液清洗已经标记的磁珠,混匀 30 秒,上架,去上清,重复操作 3 次;(8)、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶,即为 0.05% 的 IgE 磁分离试剂;磁珠保存液配方为 0.1% BSA,0.05% Brij35,0.02% Na₃N,4℃ 保存;(9)、将获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1:1 的比例混匀,即得磁分离试剂;

[0017] 步骤二、过敏原试剂的制备

[0018] 一、过敏原稀释液的配置

[0019] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾,6.81g/L NaCl,0.5ml/L Brij35 于 1L 容器中;(2)、量取 0.5-1ml Proclin-300 于 1L 容器中;量取 800ml 纯化水于上述容器,充分搅拌;(3)、称取 0.5~1g 硫酸镁于 1L 容器中;(4) 调节 PH 值到 7.95-8.05 之间;(5)、称取 2g BSA 至上述 1L 容器中;(6) 称去 0.5~1g 明胶于上述 1L 容器 (6)、最后定容至 1000ml,0.22um 微孔滤器过滤;做好标记于 2-8℃ 冷库贮存;

[0020] 二、生物素偶联的过敏原的配置

[0021] 将生物素标记的食物过敏原按照 0.1-1.0ug/ml 的浓度,使用过敏原稀释液进行稀释;

[0022] 步骤三、酶反应物的制备

[0023] 一、酶反应物稀释液配置

[0024] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾于烧瓶中,然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;(2)称取 0.5~1g 硫酸镁于 1L 容器中(3)、调 PH,控制在 7.0-7.2;(4)、称取 2g BSA 至上述烧瓶中;(5)、称取 0.5~1g 明胶于 1L 容器中;(6)、最后烧杯定容至 1000ml,用 0.22um 微孔滤器过滤即得;

[0025] 二、酶反应物的配置

[0026] 按照 1:2000-1:5000 的稀释体积比例,使用酶反应物稀释液对辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素进行稀释,混合均匀即得酶反应物;

[0027] 步骤四、校准品、质控品的制备

[0028] 一、校准品、质控品稀释液的配置

[0029] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾于 1L 的容器中,定容至 1L;(2)、调节 pH 值至 7.0-7.2;(3)用量筒量取小牛血清 300ml,加入上述溶液中,即为校准品稀释液,2-8℃ 储存备用;

[0030] 二、校准品、质控品的配置

[0031] 校准品的浓度为 0、0.35、0.7、3.5、17.5、100KU/L,质控品的浓度分别为 0.35、17.5KU/L,使用校准品、质控品稀释液按照以上浓度进行稀释,校准品、质控品所含物质为纯化的人 IgE 抗体;

[0032] 步骤五、浓缩清洗液的配制

[0033] (1)、称取 KCl 4g、NaCl 40g、蔗糖 10g 于 1L 容器中;(2)、称取 0.225g Tween-20 于 100ml 容器中加 15ml 水使其完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;(3)、量取 Proclin-300 0.225ml 至上述 1L 容器中;(4)、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;(5)、调 PH 至 7.35-7.45 之间;(6)、最后定容至 1000ml,完全溶解后用 0.22um 微孔滤器过滤即得;

[0034] 步骤六、底物液的制备

[0035] 一、底物 A 液的配置

[0036] (1)、称取硼砂 5.721g、硼酸 2.474g、鲁米诺 1.0g 和对碘苯酚 0.1mg 于 1L 烧杯中;(2)、用量筒量取 400ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调节 PH 值至 7.95-8.05 之间;(3)、用 0.22um 微孔滤器过滤,收集滤液,用纯化水定容至 500ml,混匀后即得;

[0037] 二、底物 B 液的配置

[0038] (1)、称取硼砂 5.721g、硼酸 2.474g、过氧化脲 0.1g 和 Proclin-300 250ul 于 1L 烧杯中;(2)、用量筒量取 400ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 PH 值至 7.95-8.05 之间;(3)、用 0.22um 微孔滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至 500ml,混匀后即得。。

[0039] 本发明还提供了食物过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0040] (1)、加入 50 μ l 磁分离试剂至化学发光反应管底;

[0041] (2)、加入 50 μ l 标准品、质控品、待检血清至化学发光反应管底;

[0042] (3)、用多功能均匀混合器轻轻振荡反应管 30s 后,置 37℃ 恒温箱反应 15 分钟;

[0043] (4)、反应管放至磁分离器上,确保每个管底都与分离器表面接触,沉淀 2-3 分钟;缓慢的倒转分离器倒出上清液,用力在吸水纸上将反应管内的液体拍干,以除去粘在反应管中的液滴;

[0044] (5)、浓缩清洗液用纯化水稀释 20 倍后,加 300-500 μ l 稀释后的清洗液至每一反应管中,置多功能均匀混合器上轻轻振荡混匀 30s;

[0045] (6)、重复步骤 (4)、(5)、(4) 一遍;

[0046] (7)、加入 50 μ l 过敏原试剂至反应管底;

[0047] (8)、加入 50 μ l 酶反应物至反应管底;

[0048] (9)、用多管均匀混合器轻轻振荡反应管 30s 后,置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 15 分钟;

[0049] (10)、重复步骤 (4)、(5)、(6) 一遍;

[0050] (11)、加入 50 μ l 底物液 A 和 50 μ l 底物液 B 至反应管底手动混匀(或放置在多管均匀混合器上轻轻震荡 5-10s),迅速用准备好的发光检测仪进行检测;

[0051] (12)、根据校准品采用四参数拟合方式拟合一条曲线,通过曲线计算待检样本所含的食物过敏原特异性 IgE 抗体的浓度。

[0052] 本发明的工作原理:本发明为捕获法化学发光免疫分析法与磁微粒分离技术相结合的一种检测方法。用包被有抗人 IgE 的磁微粒与血清中的人 IgE 反应,在外加磁场的作用下直接沉淀,然后加入生物素标记的屋尘螨过敏原,偶联在磁微粒上的人 IgE 中的过敏原特异性 IgE 抗体捕获生物素标记的食物过敏原,经洗涤后,加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶,催化底物发光。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,即可使用发光仪检测反应的发光强度。在检测范围内,反应的发光强度与样本中的食物过敏原特异性 IgE 抗体浓度成正比。

[0053] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0054] 本发明食物过敏原特异性 IgE 抗体定量检测试剂盒,其检测方法为化学发光免疫分析技术和磁微粒分离技术相结合的一种检测方法,同时采用了酶免的捕获方法,具有操作方便、灵敏度高、准确性好、快速和无污染的特点。

[0055] 本发明过敏原特异性 IgE 抗体定量检测试剂盒所采用的检测方法,通过过敏原特异性 IgE 抗体捕获过敏原的方法来实现的,同时采用化学发光免疫技术和磁分离技术相结合的方法,大大提高了过敏原特异性抗体的检测灵敏度和特异性,使得检测结果更真实可信;同时优化了反应时间和反应步骤,使操作更简单。

具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施例进一步阐述本发明,应理解,以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围。

[0057] 下列实施例中所用方法如无特别说明,均为常规方法。以下实施例中所需要的材料或试剂,如无特殊说明均为市场购得。

[0058] 试剂盒含有如下组分:磁分离试剂、过敏原试剂、酶反应物、校准品、质控品、浓缩清洗液以及底物液(含 A 液和 B 液)。其中,过敏原试剂含有生物素标记的特异性过敏原,磁分离试剂含有包被有抗人 IgE 抗体的磁微粒。

[0059] 实施例 1 过敏原特异性 IgE 抗体定量检测试剂盒的制备

[0060] 步骤一、磁分离试剂的制备

[0061] 一、磁微粒缓冲液配制

[0062] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾, 6.81g/L NaCl, 0.5g/L Brij35 于 1L 容器中; (2)、量取 0.5-1ml Proclin-300 于 1L 容器中; 量取 800ml 纯化水于上述容器, 充分搅拌; (3)、调节 PH 值到 7.9-8.2 之间; (4)、称取 2g BSA 至上述 1L 容器中; (5)、最后定容至 1000ml, 0.22um 微孔滤器过滤; 做好标记于 2-8℃ 冷库贮存;

[0063] 二、磁分离试剂的制备

[0064] (1)、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中, 取 2mg 抗人 IgE 抗体溶于 PH 9.0-9.5 的 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液中至总体积为 1ml; (2)、确定辛二酸二琥珀酰亚胺酯的投入量, 用移液枪吸取辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到上述抗人 IgE 抗体溶液中, 置室温 90min; (3)、然后将抗体溶液加入到 Centricon-10 浓缩管中, 放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml; (4)、取 0.8ml 磁珠加入 5ml 反应杯中, 放入专用试管架, 经磁铁充分吸附约 5 分钟后移取掉上清; (5)、每次加入 2ml PH9.5 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次; 将获得的抗体溶液加入到上述磁珠中, 混匀后室温反应过夜; (6)、加入 0.3ml 1mol/L 的磷酸盐溶液 37℃ 15 分钟; (7)、每次加入 1.5ml PH7.2 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液清洗已经标记的磁珠, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次; (8)、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶, 即为 0.05% 的 IgE 磁分离试剂; 磁珠保存液配方为 0.1% BSA, 0.05% Brij35, 0.02% Na₃N, 4℃ 保存; (9)、将获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1:1 的比例混匀, 即得磁分离试剂;

[0065] 步骤二、过敏原试剂的制备

[0066] 一、过敏原稀释液的配置

[0067] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾, 6.81g/L NaCl, 0.5ml/L Brij35 于 1L 容器中; (2)、量取 0.5-1ml Proclin-300 于 1L 容器中; 量取 800ml 纯化水于上述容器, 充分搅拌; (3)、称取 0.5~1g 硫酸镁于 1L 容器中; (4) 调节 PH 值到 7.95-8.05 之间; (5)、称取 2g BSA 至上述 1L 容器中; (6) 称去 0.5~1g 明胶于上述 1L 容器 (6)、最后定容至 1000ml, 0.22um 微孔滤器过滤; 做好标记于 2-8℃ 冷库贮存;

[0068] 二、生物素偶联的过敏原的配置

[0069] 将生物素标记的食物过敏原按照 0.1-1.0ug/ml 的浓度, 使用过敏原稀释液进行稀释;

[0070] 步骤三、酶反应物的制备

[0071] 一、酶反应物稀释液配置

[0072] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾于烧瓶中, 然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水, 充分搅拌使试剂完全溶解; (2) 称取 0.5~1g 硫酸镁于 1L 容器中 (3)、调 PH, 控制在 7.0-7.2; (4)、称取 2g BSA 至上述烧瓶中; (5)、称取 0.5~1g 明胶于 1L 容器中; (6)、最后烧杯定容至 1000ml, 用 0.22um 微孔滤器过滤即得;

[0073] 二、酶反应物的配置

[0074] 按照 1:2000-1:5000 的稀释体积比例, 使用酶反应物稀释液对辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素进行稀释, 混合均匀即得酶反应物;

[0075] 步骤四、校准品、质控品的制备

[0076] 一、校准品、质控品稀释液的配置

[0077] (1)、称取 13.44g/L 磷酸氢二钾于 1L 的容器中,定容至 1L;(2)、调节 pH 值至 7.0-7.2;(3) 用量筒量取小牛血清 300ml,加入上述溶液中,即为校准品稀释液,2-8℃ 储存备用;

[0078] 二、校准品、质控品的配置

[0079] 校准品的浓度为 0、0.35、0.7、3.5、17.5、100KU/L,质控品的浓度分别为 0.35、17.5KU/L,使用校准品、质控品稀释液按照以上浓度进行稀释,校准品、质控品所含物质为纯化的人 IgE 抗体;

[0080] 步骤五、浓缩清洗液的配制

[0081] (1)、称取 KCl 4g、NaCl 40g、蔗糖 10g 于 1L 容器中;(2)、称取 0.225g Tween-20 于 100ml 容器中加 15ml 水使其完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;(3)、量取 Proclin-300 0.225ml 至上述 1L 容器中;(4)、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;(5)、调 PH 至 7.35-7.45 之间;(6)、最后定容至 1000ml,完全溶解后用 0.22um 微孔滤器过滤即得;

[0082] 步骤六、底物液的制备

[0083] 一、底物 A 液的配置

[0084] (1)、称取硼砂 5.721g、硼酸 2.474g、鲁米诺 1.0g 和对碘苯酚 0.1mg 于 1L 烧杯中;(2)、用量筒量取 400ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调节 PH 值至 7.95-8.05 之间;(3)、用 0.22um 微孔滤器过滤,收集滤液,用纯化水定容至 500ml,混匀后即得;

[0085] 二、底物 B 液的配置

[0086] (1)、称取硼砂 5.721g、硼酸 2.474g、过氧化脲 0.1g 和 Proclin-300 250ul 于 1L 烧杯中;(2)、用量筒量取 400ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 PH 值至 7.95-8.05 之间;(3)、用 0.22um 微孔滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至 500ml,混匀后即得。

[0087] 对比例 1

[0088] 将实施例 1 中的步骤一至四的缓冲液磷酸氢二钾替换为 Tris(三羟甲基氨基甲烷),制得的检测试剂盒。

[0089] 实施例 2 过敏原特异性 IgE 抗体的检测

[0090] (1)、加入 50 μl 磁分离试剂至化学发光反应管底;

[0091] (2)、加入 50 μl 标准品、质控品、待检血清至化学发光反应管底;

[0092] (3)、用多功能均匀混合器轻轻振荡反应管 30s 后,置 37℃ 恒温箱反应 15 分钟;

[0093] (4)、反应管放至磁分离器上,确保每个管底都与分离器表面接触,沉淀 2-3 分钟;缓慢的倒转分离器倒出上清液,用力在吸水纸上将反应管内的液体拍干,以除去粘在反应管中的液滴;

[0094] (5)、浓缩清洗液用纯化水稀释 20 倍后,加 300-500 μl 稀释后的清洗液至每一反应管中,置多功能均匀混合器上轻轻振荡混匀 30s;

[0095] (6)、重复步骤 (4)、(5)、(4) 一遍;

[0096] (7)、加入 50 μl 过敏原试剂至反应管底;

- [0097] (8)、加入 50 μ l 酶反应物至反应管底；
- [0098] (9)、用多管均匀混合器轻轻振荡反应管 30s 后，置 37°C 恒温箱反应 15 分钟；
- [0099] (10)、重复步骤 (4)、(5)、(6) 一遍；
- [0100] (11)、加入 50 μ l 底物液 A 和 50 μ l 底物液 B 至反应管底手动混匀（或放置在多管均匀混合器上轻轻震荡 5-10s），迅速用准备好的发光检测仪进行检测；
- [0101] (12)、根据校准品采用四参数拟合方式拟合一条曲线，通过曲线计算待检样本所含的食物过敏原特异性 IgE 抗体的浓度。

[0102] 实施例 3 检测结果

[0103] 用实施例 1 和对比例 1 制得的检测试剂盒按照实施例 2 的方法进行检测，同时采用美国 BIOMERICA 公司所生产的过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒采用间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 6 个血清样品 (3 个强阳样品、3 个弱阳样品) 中所包含的 8 种最常见的过敏原 (牛奶、鸡蛋、大豆、花生、小麦、蟹、虾、粉尘螨) 的特异性抗体 IgE，见表 1。

[0104] 表 1 过敏原特异性抗体 IgE 阳性的过敏原数量统计

[0105]

	实施例 1 试剂盒	对比例 1 试剂盒	美国 BIOMERICA 公司试剂盒
样品 1 (强阳)	8	8	8
样品 2 (强阳)	6	5	6
样品 3 (强阳)	2	2	2

[0106]

样品 4 (弱阳)	6	4	6
样品 5 (弱阳)	6	5	5
样品 6 (弱阳)	1	1	1

[0107] 从表 1 可以看出，对于强阳样品 1-3，本申请实施例 1 的检测结果与美国 BIOMERICA 公司试剂盒一样，但对比例 1 对样品 2 中的一个过敏原 (小麦) 没有检测出来；对于弱阳样品 4-6，本申请实施例 1 对样品 5 的检测比美国 BIOMERICA 公司试剂盒多检测出一个过敏原 (大豆)，对比例 1 则对样品 4 和样品 5 都漏检一个过敏原。所以本申请实施例 1 的试剂盒的检测灵敏度更高。

[0108] 另外，采用美国 BIOMERICA 公司所生产的过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒进行检测需要 30-90 分钟才能显色，而本发明的检测时间大大减少，检测灵敏度更高。

[0109] 工作原理：

[0110] 本发明为捕获法化学发光免疫分析法与磁微粒分离技术相结合的一种检测方法。用包被有抗人 IgE 的磁微粒与血清中的人 IgE 反应，在外加磁场的作用下直接沉淀，然后加入生物素标记的屋尘螨过敏原，偶联在磁微粒上的人 IgE 中的过敏原特异性 IgE 抗体捕获

生物素标记的食物过敏原,经洗涤后,加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶,催化底物发光。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,即可使用发光仪检测反应的发光强度。在检测范围内,反应的发光强度与样本中的食物过敏原特异性 IgE 抗体浓度成正比。

专利名称(译)	食物过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN104820090A	公开(公告)日	2015-08-05
申请号	CN201510246552.5	申请日	2015-05-13
[标]发明人	刘成安 周凯 刘斌 许晓元 陈美		
发明人	刘成安 周凯 刘斌 许晓元 陈美		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/53 G01N21/76 G01N33/54333		
代理人(译)	朱莹莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体涉及用于体外定量测定人血清中的针对食物过敏原特异性IgE抗体的含量的食物过敏原特异性IgE抗体(定量)检测试剂盒及其制备和检测方法。一种食物过敏原特异性IgE抗体检测试剂盒，含有如下组分：磁分离试剂、过敏原试剂、酶反应物、校准品、质控品、浓缩清洗液以及底物液；所述磁分离试剂含有包被有抗人IgE抗体的磁微粒，所述过敏原试剂含有生物素标记的特异性过敏原。本发明食物过敏原特异性IgE抗体定量检测试剂盒，其检测方法为化学发光免疫分析技术和磁微粒分离技术相结合的一种检测方法，同时采用了酶免的捕获方法，具有操作方便、灵敏度高、准确性好、快速和无污染的特点。

	实施例1 试剂盒	对比例1 试剂盒	美国 BIOMERICA 公司试剂盒
样品1 (强阳)	8	8	8
样品2 (强阳)	6	5	6
样品3 (强阳)	2	2	2