



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107478844 B

(45)授权公告日 2019.04.23

(21)申请号 201710623119.8

C09K 11/06(2006.01)

(22)申请日 2017.07.27

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107478844 A

CN 103837674 A, 2014.06.04,

CN 103597353 A, 2014.02.19,

CN 105137062 A, 2015.12.09,

(43)申请公布日 2017.12.15

CN 104198710 A, 2014.12.10,

CN 101706501 A, 2010.05.12,

(73)专利权人 江南大学

CN 102633265 A, 2012.08.15,

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

CN 101706502 A, 2010.05.12,

(72)发明人 吴静 云建荣 姚瑞

Gengeng Qi et al. Facile and Scalable

Synthesis of Monodispersed Spherical

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

Capsules with a Mesoporous Shell.《Chem. Mater.》.2010,第22卷(第9期),

代理人 张勇

Nathan J. Wittenberg et al. Using

(51) Int. Cl.

nanoparticles to push the limits of

G01N 33/68(2006.01)

detection.《John Wiley & Sons》.2009,第1卷

G01N 33/533(2006.01)

审查员 舒霏霏

C09K 11/02(2006.01)

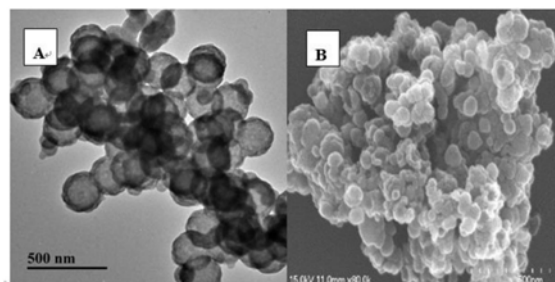
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

一种检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E方法,属于材料与生物医学交叉领域。本发明采用荧光中空介孔二氧化硅FHMNs作为抗IgE抗体的载体,二氧化硅包覆四氧化三铁制备所得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 作为过敏原载体,两种材料同时捕获靶标刀额新对虾特异性免疫球蛋白E(IgE),利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的磁性快速富集和分离靶标sIgE,利用FHMNs中的荧光分子信号放大低浓度靶标sIgE的信号,将荧光强度与IgE浓度相关联,快速灵敏的检测人血中刀额新对虾的特异性IgE。本发明有效降低了IgE检测限,缩短了检测时间。



1. 一种不以疾病的诊断或治疗为目的的特异性免疫球蛋白E检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:

- (1) 由内含荧光分子的中空介孔二氧化硅连接抗免疫球蛋白E抗体作为荧光探针;
- (2) 由二氧化硅包覆四氧化三铁制备所得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 连接过敏原作为磁性探针;
- (3) 将步骤(1)的荧光探针和步骤(2)的磁性探针同时加入含有特异性免疫球蛋白E的血清中;
- (4) 孵育,磁分离去上清,采用缓冲液冲洗后加入碱液,然后超声释放荧光分子,检测荧光强度。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述荧光探针为粒径为190-210nm,内径为120-140nm;或粒径为110-120nm,内径为60-70nm。

3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述磁性探针的粒径为100-120nm。

4. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述方法中血清溶液pH 11,孵育时间为120min,孵育温度为37℃。

5. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述方法还包括:

(1) 取含有不同浓度特异性免疫球蛋白E的血清溶液,利用权利要求1所述方法测定荧光强度;

(2) 构建特异性免疫球蛋白E浓度与荧光强度的回归方程;

(3) 将待检测血清采用相同的方法检测荧光强度,带入步骤(2)中的回归方程,计算待检测血清中特异性免疫球蛋白E浓度。

6. 权利要求1所述方法在特异性免疫球蛋白E检测中的应用。

7. 权利要求1所述方法在检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E中的应用。

8. 根据权利要求7所述应用,其特征在于,所述应用是采用粒径为190-210nm,内径为120-140nm的荧光探针作为抗免疫球蛋白E抗体的载体,粒径为100-120nm的磁性探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 作为过敏原载体,两种材料同时捕获靶标刀额新对虾特异性免疫球蛋白E,利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的磁性快速富集和分离靶标;所述应用的回归方程为: $y = 6489 - 0.02037 * 208.3^{-x} - 456.7249 * 0.5113^x$, $R^2 = 0.9959$,特异性免疫球蛋白E最低检测限为0.0159ng/mL。

9. 根据权利要求7所述应用,其特征在于,所述应用是采用粒径为110-120nm,内径为60-70nm的荧光探针作为抗免疫球蛋白E抗体的载体,粒径为100-120nm的磁性探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 作为过敏原载体,两种材料同时捕获靶标刀额新对虾特异性免疫球蛋白E,利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的磁性快速富集和分离靶标;所述应用的回归方程为: $y = 2119 - 12270x$, $R^2 = 0.9908$,特异性免疫球蛋白E最低检测限为0.0180ng/mL。

10. 根据权利要求7所述应用,其特征在于,所述过敏原为原肌球蛋白或精氨酸激酶。

一种检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E方法,属于材料与生物医学交叉领域。

背景技术

[0002] 虾、蟹是我国水产品市场上最常见的甲壳类食品,属于高蛋白、高营养类食物。但同时也是八大类高致敏性食物之一,发生率为15.6%-35%,导致过敏性哮喘、过敏性休克等疾病的发生。

[0003] 目前,我国在过敏相关研究领域处于起步阶段,尚无虾、蟹类食物过敏症的相关诊断试剂。临床上使用的检测试剂主要依赖进口,如美国FDA认证的Immuno CAP system自动检测系统,其公认的检测限为0.24ng/mL,且检测费用较昂贵,大多数过敏患者不能负担;临床上使用较广的ELISA检测试剂盒,其检测限较高,并不能准确鉴定是否为过敏患者。且目前过敏检测所用过敏原为生物材料粗提产物,粗提产物包含过敏原与非特异性过敏原以及目前尚未定性的疑似过敏原,对过敏检测结果存在干扰性,且其致敏效率无法达到标准化。同时,过敏性疾病的发生,与个体的遗传背景、患者的生活居住环境、变应原物种、过敏原接触史等因素密切相关。因此,很有必要使用纯化的甲壳类水产品中主要过敏原、开发快速灵敏的检测方法。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供一种过敏检测平台,用于特异性过敏检测。

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种特异性过敏检测方法,所述过敏检测方法包括以下步骤:

[0006] (1) 由内含荧光分子的中空介孔二氧化硅连接抗免疫球蛋白E抗体作为荧光探针;

[0007] (2) 由二氧化硅包覆四氧化三铁制备所得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 连接过敏原作为磁性探针;

[0008] (3) 将步骤(1)的荧光探针和步骤(2)的磁性探针同时加入含有特异性免疫球蛋白E的血清中;

[0009] (4) 孵育,离心去上清,采用缓冲液冲洗后加入碱液,然后超声释放荧光分子,检测荧光强度。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针为粒径为190-210nm,内径为120-140nm;或粒径为110-120nm,内径为60-70nm。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,所述磁性探针的粒径为100-120nm。

[0012] 在本发明的一种实施方式中,所述方法中血清溶液pH 10-12,孵育时间为100-120min,孵育温度为35-38℃。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,所述方法还包括:

[0014] (1) 取含有不同浓度特异性免疫球蛋白E的血清溶液,利用上述方法测定荧光强度;

[0015] (2) 构建特异性免疫球蛋白E浓度与荧光强度的回归方程;

[0016] (3) 将待检测血清采用相同的方法检测荧光强度, 带入步骤(2)中的回归方程, 计算待检测血清中特异性免疫球蛋白E浓度。

[0017] 本发明的第二个目的是提供所述过敏检测方法在特异性过敏检测中的应用。

[0018] 本发明的第三个目的是提供所述过敏检测方法在检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E中的应用。

[0019] 在本发明的一种实施方式中, 所述应用是采用粒径为190-210nm, 内径为120-140nm的荧光探针作为抗免疫球蛋白E抗体的载体, 粒径为100-120nm的磁性探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 作为过敏原载体, 两种材料同时捕获靶标刀额新对虾特异性免疫球蛋白E, 利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的磁性快速富集和分离靶标; 所述应用的回归方程为: $y = 6489 - 0.02037 * 208.3^{-x} - 456.7249 * 0.5113^x$, $R^2 = 0.9959$, 特异性免疫球蛋白E最低检测限为0.0159ng/mL。

[0020] 在本发明的一种实施方式中, 所述应用是采用粒径为110-120nm, 内径为60-70nm的荧光探针作为抗免疫球蛋白E抗体的载体, 粒径为100-120nm的磁性探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 作为过敏原载体, 两种材料同时捕获靶标刀额新对虾特异性免疫球蛋白E, 利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的磁性快速富集和分离靶标; 所述应用的回归方程为: $y = 2119 - 12270x$, $R^2 = 0.9908$, 特异性免疫球蛋白E最低检测限为0.0180ng/mL。

[0021] 在本发明的一种实施方式中, 所述过敏原为原肌球蛋白或精氨酸激酶。

[0022] 本发明有益效果

[0023] 利用FHMNs中的荧光分子放大低浓度靶标特异性免疫球蛋白E的信号, 将荧光强度与特异性免疫球蛋白E浓度相关联, 快速灵敏的检测人血中刀额新对虾的特异性免疫球蛋白E。

附图说明

[0024] 图1中空介孔二氧化硅HMNs-A检测图A:透射电镜TEM检测;B:扫描电镜SEM检测;

[0025] 图2中空介孔二氧化硅HMNs-B检测图A:透射电镜TEM检测;B:扫描电镜SEM检测;

[0026] 图3透射电镜TEM检测A: Fe_3O_4 ;B: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 检测图;

[0027] 图4检测条件优化:A:pH;B:温度;C:时间;

[0028] 图5FHMNs-A为荧光探针时荧光强度与不同浓度IgE关系曲线;

[0029] 图6FHMNs-B为荧光探针时荧光强度与不同浓度IgE关系曲线;

[0030] 图7荧光强度与不同来源IgE血清之间的关系。

具体实施方式

[0031] 实施例1:不同粒径荧光探针FHMNs@PDPA@PAA制备

[0032] 将十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)粉末溶解在29mL去离子水、12mL乙醇和1mL氨水的混合液中, 然后向反应液中加入聚苯乙烯微球分散液(分散于10mL去离子水中), 室温下磁搅拌60min后, 逐滴加入正硅酸乙酯(TEOS), 保持一定的搅拌速度150rpm/min, 在室温下继续搅拌48h。待反应结束后, 反应液经反复真空抽滤、洗涤数次后, 于真空干燥箱中65℃干燥12h, 得到核壳型PS/SiO₂复合微球粉末。在550℃煅烧8h, 除去模板聚苯乙烯, 得到中空二氧化硅。取0.05g HMNs与0.012g 5(6)-异硫氰酸荧光素(FITC)分散于5mL去离子水中, 于室

温下搅拌48h,将得到的复合物离心,40℃干燥得到荧光标记的中介孔二氧化硅FHMNs。取10mg FHMNs分散入0.2%十六烷基三甲基氯化铵溶液(PDDA),搅拌30min产生均相悬浮液,复合物离心水洗无处残留PDDA,将沉淀迅速分散于0.5%聚丙烯酸(PAA)搅拌30min,高速离心去除残留PAA,聚合物PDDA与PAA保护内在的荧光分子不被泄露,重复操作直至产生自组装的FHMNs@PDDA@PAA,即为荧光探针。

[0033] 形貌表征:将制备好的中空介孔二氧化硅HMNs取适量分散于乙醇溶液中,超声后滴加7 μ l于铜网干燥后用透射电镜TEM检测;扫描电镜SEM检测。由检测图1看出制备的HMNs-A粒径约200nm,内径约130nm,形貌完整,制备的HMNs-B粒径约105nm,内径约65nm,形貌完整。

[0034] 实施例2:磁性探针Fe₃O₄@SiO₂@PAA纳米粒子制备

[0035] 称取300mgFe₃O₄分散于40mL乙醇与4mL去离子水的混合液,超声15min后,保持一定的搅拌速度,加入5mL氨水,缓慢加入2mLTEOS,室温下反应12h,磁分离后用0.1mol/L盐酸溶液、去离子水各洗涤3次,40℃干燥12h,得红褐色沉淀即为四氧化三铁/二氧化硅壳核纳米粒子。将制得的Fe₃O₄@SiO₂分散于二甲基酰胺(DMF)中,与溶有2g聚丙烯酸(PAA)的33mL DMF混合,超声30min,混合物剧烈搅拌并加热至110℃,加入溶有4-二甲氨基吡啶的3.3mLDMF和溶有N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)的6.6mLDMF,混合物保持110℃搅拌12h后,产物磁分离,用乙醇洗涤3次,60℃干燥12h得到磁性探针Fe₃O₄@SiO₂@PAA。

[0036] 形貌表征:将Fe₃O₄与制备好的Fe₃O₄@SiO₂分别取适量分散于乙醇溶液中,超声后滴加7 μ l于铜网干燥后用透射电镜TEM检测。由检测图3看出Fe₃O₄粒径7-20nm,成功包覆SiO₂形成壳核结构形成Fe₃O₄@SiO₂,粒径约100nm。

[0037] 实施例3pH优化过程、时间优化过程、温度优化过程分别给出pH优化

[0038] 取适量Fe₃O₄@SiO₂@PAA—antigens和FHMNs@PDDA@PAA—Ab2加入刀额新对虾阳性IgE(特异性免疫球蛋白E),在一定温度下孵育后,磁分离收集沉淀,用磷酸盐缓冲液(pH7.4)洗涤3次,磁分离收集沉淀,加入3mL不同pH的氢氧化钠溶液超声20min,溶解中空介孔壳,释放荧光分子,检测荧光强度,结果如图4A所示,在pH 11时,荧光强度最大,所以选择pH 11的氢氧化钠溶液为检测溶液。

[0039] 温度优化

[0040] 取适量Fe₃O₄@SiO₂@PAA—antigens和FHMNs@PDDA@PAA—Ab2加入刀额新对虾阳性IgE,分别在25℃,37℃,45℃,60℃孵育一定时间后,磁分离收集沉淀,用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤3次,磁分离收集沉淀,加入3mL一定pH的氢氧化钠溶液超声20min,溶解中空介孔壳,释放荧光分子,检测荧光强度,结果如图4B所示,在37℃时荧光强度最大,所以选择37℃孵育。

[0041] 时间优化

[0042] 取适量Fe₃O₄@SiO₂@PAA—antigens和FHMNs@PDDA@PAA—Ab2加入刀额新对虾阳性IgE,在一定温度下分别孵育30-150min后,磁分离收集沉淀,用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤3次,磁分离收集沉淀,加入3mL一定pH的氢氧化钠溶液超声20min,溶解中空介孔壳,释放荧光分子,检测荧光强度,结果如图4C所示,在反应120min时,荧光强度最大,所以选择120min孵育时间。

[0043] 实施例4:过敏检测体系磁性荧光传感平台(EMFP)的建立

[0044] (1)取50mg制备好的FHMNs@PDDA@PAA经1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺

(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化PAA中的羧基,取适量活化的FHMNs@PDDA@PAA加入一定浓度的抗IgE抗体(Ab2),37℃孵育2h,离心去上清,用PBS洗涤3次,加入封闭液37℃封闭1h,离心去上清,收集制备好的FHMNs@PDDA@PAA-Ab₂分散于PBS缓冲液中4℃保存备用。

[0045] (2)将制备好的Fe₃O₄@SiO₂@PAA纳米颗粒,经EDC/NHS活化PAA中的羧基,加入纯化的刀额新对虾主要过敏原原肌球蛋白和精氨酸激酶,37℃孵育120min,磁分离弃上清,用PBS缓冲液洗涤3次,加入封闭液37℃封闭1h,离心去上清,收集制备好的Fe₃O₄@SiO₂@PAA-antigens分散于PBS缓冲液中4℃保存备用。

[0046] 实施例5:过敏检测体系磁性荧光传感平台(EMFP)的应用

[0047] 取临床检测为刀额新对虾过敏原IgE强阳性的血清,以人血来源的IgE作为标准品,配制成不同浓度的稀释液(a):0.0125ng/mL,(b):0.0159ng/mL,(c):0.02ng/mL,(d):0.025ng/mL,(e):0.03333ng/mL,(f):0.05ng/mL,(g):0.10ng/mL,(h):0.50ng/mL,(i):1ng/mL,(j):2ng/mL,(k):5ng/mL,(l):9.895ng/mL,取100uL血清稀释液,将不同浓度的血清稀释液加入100uL Fe₃O₄@SiO₂@PAA-antigens,同时加入150uL FHMNs@PDDA@PAA-Ab₂,孵育120min,离心去上清,用PBS(pH 7.4)缓冲液洗涤3次,加入3mL 0.1mol/L NaOH(pH 11)溶液,超声20min,释放FITC荧光分子,用荧光仪检测荧光强度。

[0048] 结果如图5所示,以FHMNs-A为荧光探针检测靶标IgE,其荧光曲线在大于0.0125ng/mL呈现良好线性关系,且随着靶标IgE含量增加,荧光强度逐渐增加,回归方程: $y = 6489 - 0.02037 * 208.3^{-x} - 456.7249 * 0.5113^x$, $R^2 = 0.9959$,IgE最低检测限为0.0159ng/mL。

[0049] 如图6所示,以FHMNs-B为荧光探针检测靶标IgE,其荧光曲线在0.02-0.1042ng/mL呈现良好的线性关系,且随着靶标IgE含量增加,荧光强度逐渐降低,这是因为荧光分子FITC具有聚集诱导猝灭效应,靶标IgE含量越多,聚集的荧光分子越多,使FITC产生聚集诱导效应,其荧光强度降低,回归方程: $y = 2119 - 12270x$, $R^2 = 0.9908$,IgE最低检测限为0.0180ng/mL。

[0050] 实施例6:刀额新对虾特异性IgE检测选择性分析

[0051] 取临床诊断为中华绒螯蟹、锯缘青蟹、刀额新对虾强阳性IgE、及其混合IgE和不含IgE的空白对照,分别取相同浓度加入EMFP检测体系,检测5种条件下的荧光强度(图7),结果表明EMFP检测系统,仅对含有刀额新对虾IgE的血清呈现较高荧光强度,与空白对照相比,含有中华绒螯蟹、锯缘青蟹特异性IgE的血清呈现出可以忽略的荧光强度,综上所述表明:该EMFP检测系统,对刀额新对虾特异性IgE具有较高的特异性,检测时间为135min(120min孵育时间,15min检测时间),与传统方法检测至少需要240min相比,缩短了检测时间,简化操作步骤。

[0052] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

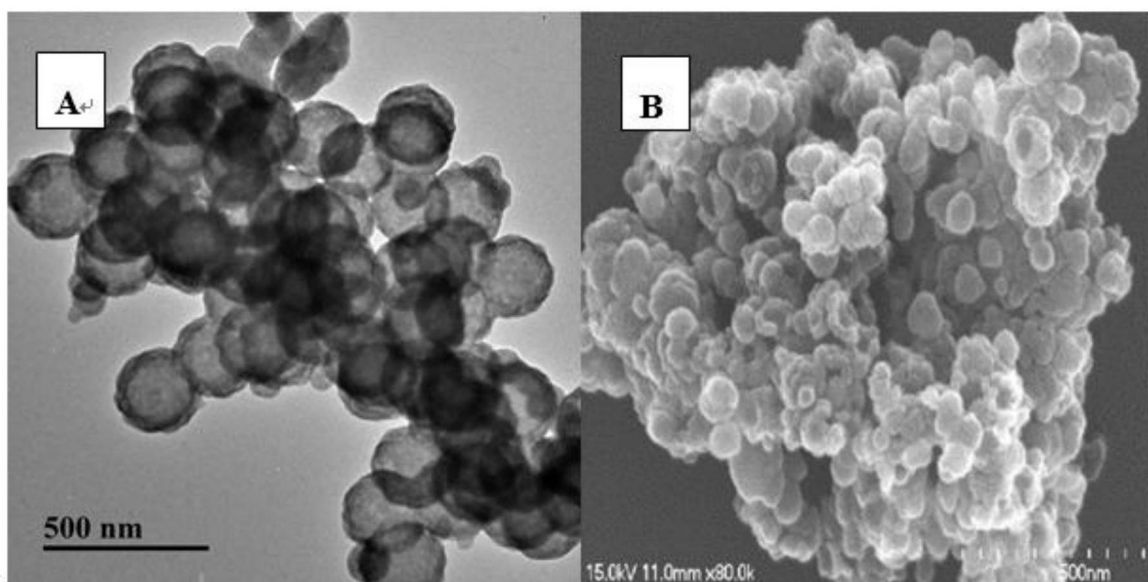


图1

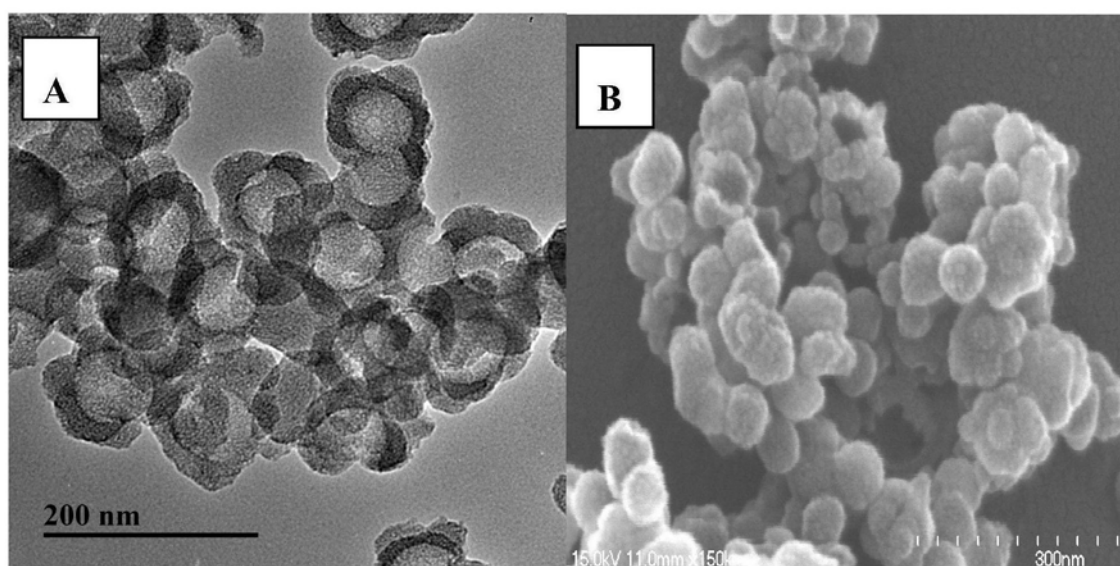


图2

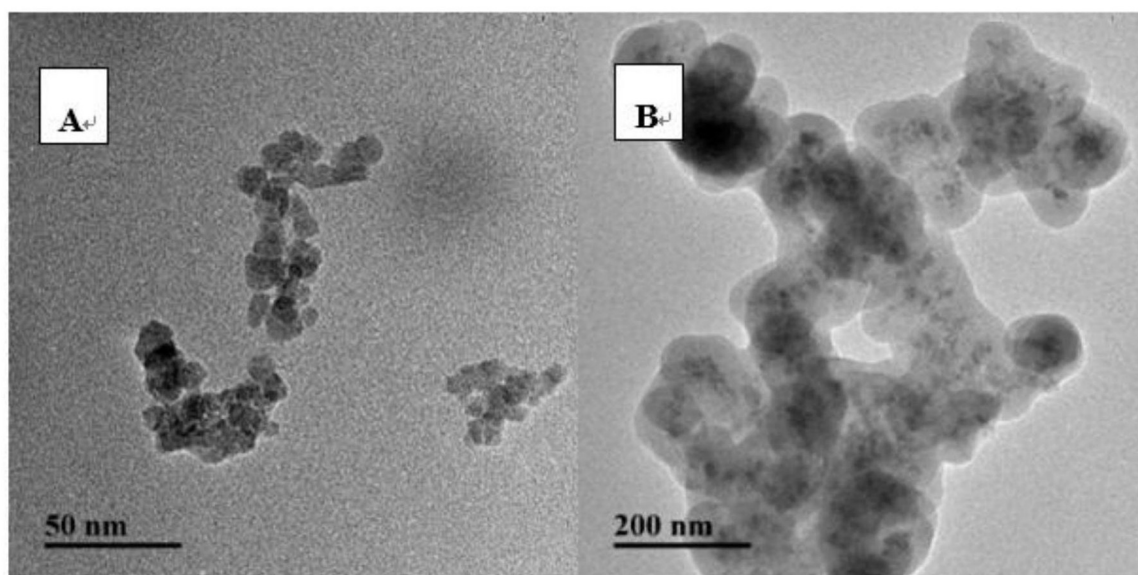
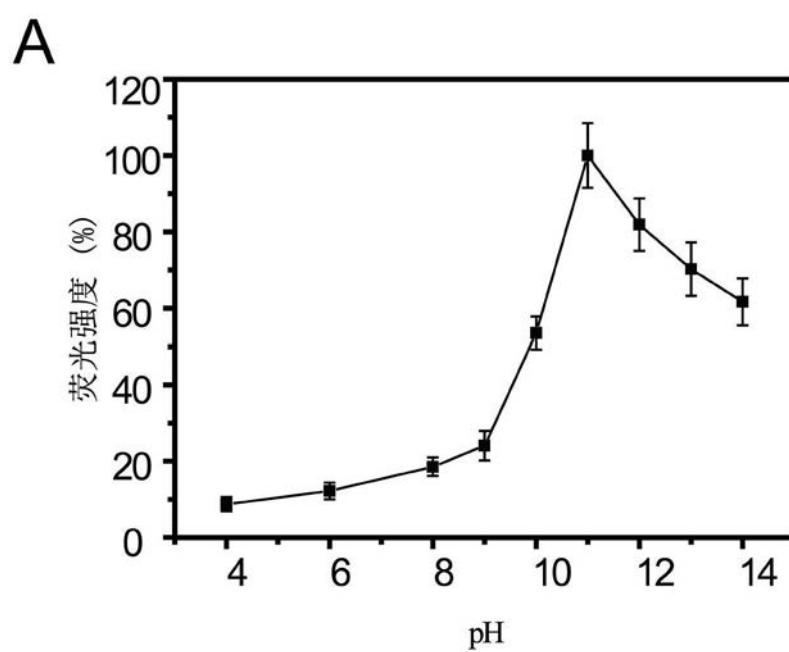


图3



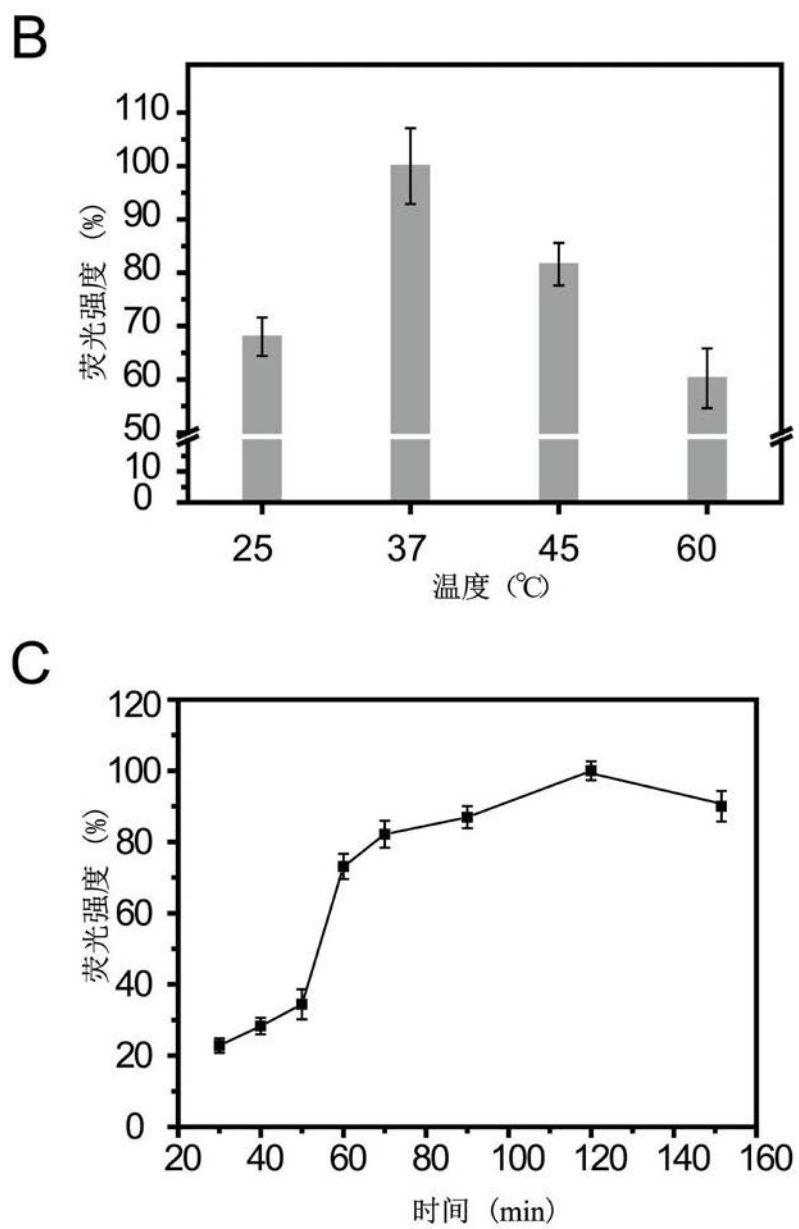


图4

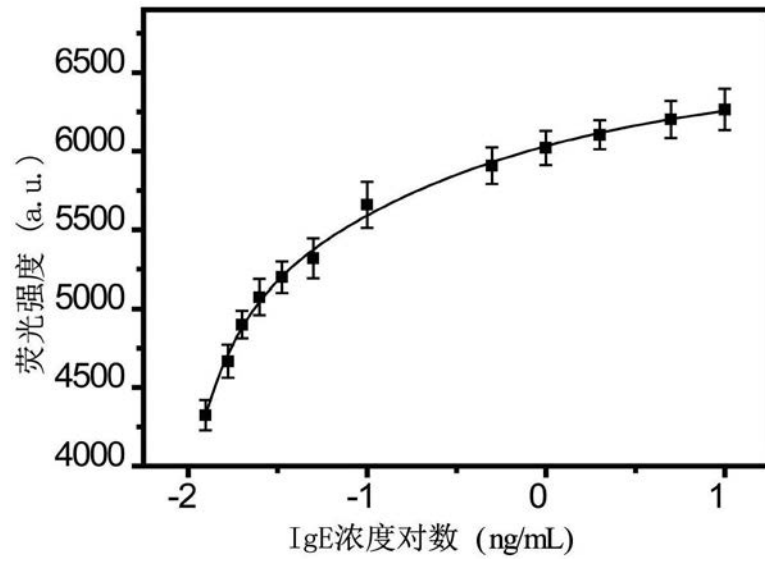


图5

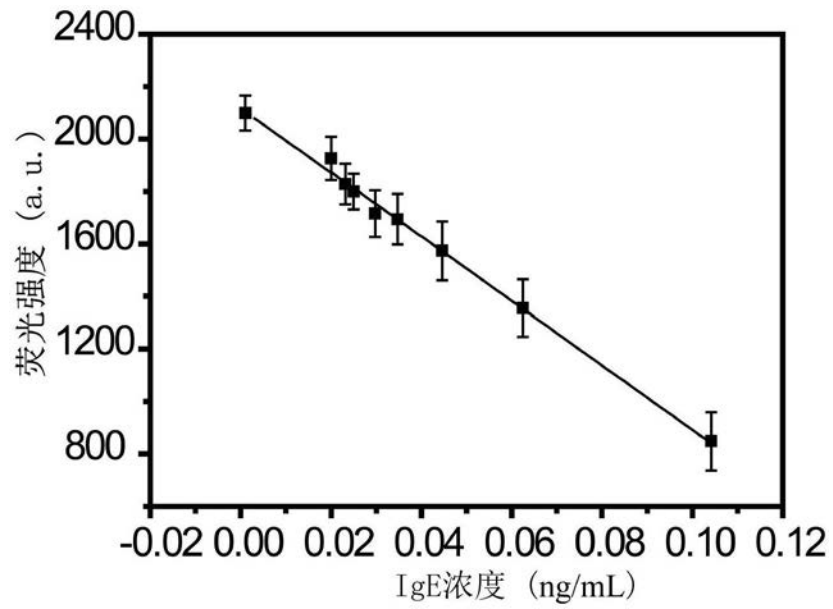


图6

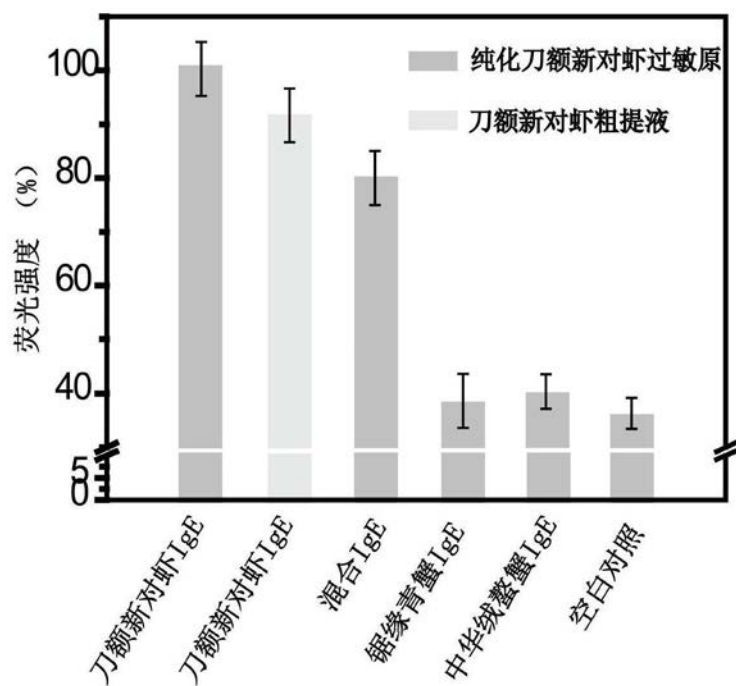


图7

专利名称(译)	一种检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E方法		
公开(公告)号	CN107478844B	公开(公告)日	2019-04-23
申请号	CN2017110623119.8	申请日	2017-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	吴静 云建荣 姚瑞		
发明人	吴静 云建荣 姚瑞		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 C09K11/02 C09K11/06		
CPC分类号	C09K11/025 C09K11/06 G01N33/533 G01N33/6854 G01N2333/47		
代理人(译)	张勇		
其他公开文献	CN107478844A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测刀额新对虾特异性免疫球蛋白E方法，属于材料与生物学交叉领域。本发明采用荧光中空介孔二氧化硅FHMNs作为抗IgE抗体的载体，二氧化硅包覆四氧化三铁制备所得的Fe₃O₄@SiO₂作为过敏原载体，两种材料同时捕获靶标刀额新对虾特异性免疫球蛋白E(IgE)，利用Fe₃O₄@SiO₂的磁性快速富集和分离靶标IgE，利用FHMNs中的荧光分子信号放大低浓度靶标IgE的信号，将荧光强度与IgE浓度相关联，快速灵敏的检测人血中刀额新对虾的特异性IgE。本发明有效降低了IgE检测限，缩短了检测时间。

