



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102565382 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201210002623. 3

(22) 申请日 2012. 01. 06

(73) 专利权人 苏州浩欧博生物医药有限公司
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号 C6 栋

(72) 发明人 李冬冬 赵文姬 张逸南

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101614737 A, 2009. 12. 30, 权利要求 1,
3, 说明书第 4 页第 9-10 行, 说明书附图.

CN 101017169 A, 2007. 08. 15, 权利要求
6, 7, 10, 11, 15, 说明书第 2 页第 3 段, 第 14 页最后
一段.

CN 101017169 A, 2007. 08. 15, 权利要求

6, 7, 10, 11, 15, 说明书第 2 页第 3 段.

CN 101078724 A, 2007. 11. 28, 全文.

CN 101495865 A, 2009. 07. 29, 全文.

CN 1415759 A, 2003. 05. 07, 全文.

CN 1508545 A, 2004. 06. 30, 全文.

CN 1743845 A, 2006. 03. 08, 全文.

WO 2006/122450 A1, 2006. 11. 23, 全文.

Berit Granum et al. Fine particles
of widely different composition have an
adjuvant effect on the production of
allergen-specific

c antibodies. 《Toxicology

Letters》. 2001, 第 118 卷 (第 3 期), 171-181.

吉坤美等. 胶体金免疫层析法检测食品中花
生过敏原蛋白成分. 《食品研究与开发》. 2009, 第
30 卷 (第 5 期), 101-105.

审查员 李宏悦

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体
的免疫层析方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法, 其首先将样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜、吸水垫依次相互交错粘贴在底板上, 构成免疫层析试纸条, 然后向样品垫中滴加血液样本进行检测, 所述结合垫上结合有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球, 该方法利用血液样本中的过敏原特异性 IgE 抗体能够与过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球结合形成结合物, 以及所形成的结合物能够在检测线处被捕获而呈现色带来实现对过敏原特异性 IgE 抗体的定性检测。本发明将生物素-亲合素系统应用于连接过敏原和乳胶微球, 能够实现在一个过敏原上连接多个乳胶微球, 从而使检测特异性 IgE 抗体的灵敏度提高, 检测结果明显, 容易观察。

CN 102565382 B

1. 一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其首先将样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜、吸水垫依次相互交错粘贴在底板上,构成免疫层析试纸条,然后向样品垫中滴加血液样本进行检测,其特征在于:所述结合垫上结合有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球,所述方法利用血液样本中的过敏原特异性 IgE 抗体能够与过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球结合形成结合物,以及所形成的结合物能够在检测线处被捕获而呈现色带来实现对过敏原特异性 IgE 抗体的定性检测,

所述的过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球通过如下方法制备:首先将过敏原与生物素连接形成过敏原-生物素,将亲合素与乳胶微球连接形成亲合素-乳胶微球,然后再将所形成的过敏原-生物素与所形成的亲合素-乳胶微球连接,即得所述的过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球;所述的过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的具体制备过程如下:

①将过敏原溶于磷酸盐缓冲液中,将生物素溶于去离子水中,然后将生物素的水溶液滴加至过敏原的磷酸盐缓冲液中,在室温下搅拌,得到含有过敏原-生物素的溶液;

②将亲合素溶液溶于脂肪酸甲酯磺酸盐缓冲液中,将乳胶微球储存液剧烈震荡,取出微球于离心管中,离心,除去上清,加入脂肪酸甲酯磺酸盐缓冲液,剧烈震荡,加入溶有亲合素的脂肪酸甲酯磺酸盐缓冲液和新鲜配制的碳二亚胺溶液,剧烈震荡,使混合均匀,在室温暗室孵育 20 ~ 40 分钟,加入吐温-20,离心,除去上清,加入十二烷基硫酸钠水溶液溶解微球,剧烈震荡,离心,除去上清,加入磷酸盐缓冲液溶解微球,剧烈震荡,得含有亲合素-乳胶微球的溶液;

③将步骤①制得的含有过敏原-生物素的溶液加入步骤②制得的含有亲合素-乳胶微球的溶液中,轻轻搅拌直至微球全部悬浮起来,然后在室温下持续搅拌 10 ~ 15 小时,即得含有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其特征在于:通过喷涂所述含有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的溶液使过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球结合到结合垫上。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其特征在于:所述的样品垫上包被有抗红细胞抗体。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其特征在于:所述的检测线通过包被鼠抗人 IgE 单克隆抗体形成。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其特征在于:所述的质控线通过包被羊抗人 IgE 的多克隆抗体形成。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其特征在于:所述的层析膜为硝基纤维素膜。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其特征在于:所述的乳胶微球为聚苯乙烯微球。

一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法。

背景技术

[0002] 免疫层析是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式,它往往以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异、高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测带),通过酶反应或直接运用可目测的标记物(如胶体金)而得到直观的实验现象(如显色)。而游离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离之目的。

[0003] 免疫层析技术目前已广泛应用于临床医疗检测中。国内外现有的商品供应及文献报道的检测项目主要包括以下方面:违禁药物检测(苯丙胺、可卡因、大麻、吗啡、海洛因等)、传染病病原检测(梅毒螺旋体、淋球菌、沙眼衣原体、幽门螺杆菌等)、激素检测、寄生虫、肿瘤标记物、心血管病检测标志物等。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金,乳胶,胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。

[0004] 由于正常情况下血清 IgE 抗体仅在 ng/ml 水平,用常规测定 IgG 或 IgM 的凝胶扩散法检测不出 IgE,因而目前常采用免疫层析法来进行检测。然而,现有的进行血清 IgE 抗体检测的免疫层析法将特异性过敏原直接连接到标记物乳胶微球上形成过敏原-乳胶微球复合物,相当于一比一的连接关系,灵敏度低,用于检测 ng/ml 水平的特异性 IgE 抗体时,检测结果颜色暗淡,不容易观察。

[0005] 生物素-亲合素系统(Biotin-Avidin-System, BAS)是 70 年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。随着各种生物素衍生物的问世, BAS 很快被广泛应用于医学各领域。近年大量研究证实,生物素-亲合素系统几乎可与目前研究成功的各种标记物结合。生物素-亲合素与标记试剂高亲合力的牢固结合及多级放大效应,使 BAS 免疫标记和有关示踪分析更加灵敏。它已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种改进的检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法。

[0007] 为解决以上技术问题,本发明采取如下技术方案:

[0008] 一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法,其首先将样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜、吸水垫依次相互交错粘贴在底板上,构成免疫层析试纸条,然后向样品垫中滴加血液样本进行检测,其特征在于:所述结合垫上结合有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球,所述方法利用血液样本中的过敏原特异性 IgE 抗体能够

与过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球结合形成结合物,以及所形成的结合物能够在检测线处被捕获而呈现色带来实现对过敏原特异性 IgE 抗体的定性检测。

[0009] 根据本发明的进一步实施方案:所述的过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球通过如下方法制备:首先将过敏原与生物素连接形成过敏原-生物素,将亲合素与乳胶微球连接形成亲合素-乳胶微球,然后再将所形成的过敏原-生物素与所形成的亲合素-乳胶微球连接,即得。

[0010] 根据本发明的一个具体方面,过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的具体制备过程如下:

[0011] ①将过敏原溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中,将生物素溶于去离子水中,然后将生物素的水溶液滴加至过敏原的磷酸盐缓冲液中,在室温下搅拌,得到含有过敏原-生物素的溶液;

[0012] ②将亲合素溶液溶于脂肪酸甲酯磺酸盐缓冲液(MES)中,将乳胶微球储存液剧烈震荡,取出微球于离心管中,离心,除去上清,加入脂肪酸甲酯磺酸盐缓冲液,剧烈震荡,加入溶有亲合素的脂肪酸甲酯磺酸盐缓冲液和新鲜配制的碳二亚胺溶液(EDC),剧烈震荡,使混合均匀,在室温暗室孵育 20~40 分钟,加入吐温-20,离心,除去上清,加入十二烷基硫酸钠水溶液(SDS)溶解微球,剧烈震荡,离心,除去上清,加入磷酸盐缓冲液溶解微球,剧烈震荡,得含有亲合素-乳胶微球的溶液;

[0013] ③将步骤①制得的含有过敏原-生物素的溶液加入步骤②制得的含有亲合素-乳胶微球的溶液中,轻轻搅拌直至微球全部悬浮起来,然后在室温下持续搅拌 10~15 小时,即得含有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的溶液。

[0014] 根据本发明,通过喷涂所述含有过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的溶液使过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球结合到结合垫上。

[0015] 优选地,在样品垫上包被有抗红细胞抗体。层析膜上的检测线通过包被鼠抗人 IgE 单克隆抗体形成。质控线通过包被羊抗人 IgE 的多克隆抗体形成。层析膜优选为硝基纤维素膜(NC 膜)。

[0016] 优选地,所述的乳胶微球为聚苯乙烯微球。

[0017] 本发明还涉及生物素-亲合素放大系统在免疫层析法中的应用。

[0018] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0019] 本发明将生物素-亲合素系统应用于连接过敏原和乳胶微球,能够实现在一个过敏原上连接多个乳胶微球,从而使检测特异性 IgE 抗体的灵敏度提高,检测结果明显,容易观察。

具体实施方式

[0020] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步详细的说明。

[0021] 实施例 1

[0022] 本实施例提供一种血清 IgE 抗体的免疫层析法,包括如下步骤:

[0023] (1)、制备过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球,具体过程如下:

[0024] ①过敏原连接生物素:将过敏原溶于 100mM 的 PBS(pH 8.0) 中,获得 1mg/ml 的过敏原溶液。将生物素溶于去离子水中,制得 2mg/ml 的生物素溶液,将该生物素溶液缓慢

滴加到过敏原溶液中,同时搅拌溶液,并使容器置于 25℃水浴中。滴加完毕,密封容器,在 25℃水浴中持续搅拌 60±5 分钟,得含有过敏原-生物素的溶液。

[0025] ②亲合素连接乳胶微球:将亲合素溶于 1ml 的 100mM MES (pH 4.5) 溶液中,获得 1mg/ml 的亲合素溶液。将微球储存液剧烈震荡 20s,取出 5.0×10^6 的微球于 Eppendorf 离心管中,以 8000g-10,000g 的转速离心 1-2min,除去上清后加 0.5ml 的 100M MES (pH 4.5),剧烈震荡 20s,加入 1ml 亲合素溶液,加入 25 μ l 新鲜配制的 10mg/ml 的 EDC,剧烈震荡,使其混合均匀,室温暗室孵育 30min,加入 1.0ml 0.02% 吐温-20,以 8000g-10,000g 的转速离心 1-2min,除去上清,获得偶联的微球,将偶联的微球溶于 1.0ml 0.1%SDS,剧烈震荡,以 8000g-10,000g 的转速离心 1-2min,除去上清,使微球溶于 100mM 的 PBS (pH 8.0),剧烈震荡 20s,计数后置于 4℃冰箱保存。

[0026] ③过敏原-生物素和亲合素-乳胶微球的连接:将 1ml 过敏原-生物素溶液,加入放置有等体积的亲合素-乳胶微球的容器中;用玻璃棒轻轻搅拌直到微球全部悬浮起来;将容器密封放置到混合器上,室温持续搅拌溶液 10-15 小时。

[0027] (2)、将制备好的过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球喷涂在结合垫上。

[0028] (3)、进行层析膜的包被:层析膜为 NC 膜,在层析膜上包被鼠抗人 IgE 单克隆抗体形成检测线(T 线);以及包被羊抗人 IgE 的多克隆抗体形成质控线(C 线),T 线与 C 线之间的距离为 5-10mm。

[0029] (4)、在样品垫上包被抗红细胞抗体。

[0030] (5)、免疫层析试纸条的组装:将样品垫、结合了过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球的结合垫、层析膜、吸水垫(滤纸)依次相互交错粘贴在底板上,裁切成长度 100-120mm,宽度 8-12mm 的试纸条,试纸条的厚度为 0.1-1mm,

[0031] (6)、样品的检测:在试纸条的样品垫上滴加 30 μ l 阳性血清(含 IgE 的标准品),等待 15min,判断结果。阳性结果:在检测线(T 线)所在的检测区和质控线(C 线)所在的质控区各出现一条红色条带;阴性结果:仅在质控区出现一条紫红色带。若检测区无色带且质控区未出现紫红色带,表明不正确的操作或试剂无效,需重新进行检测试验。

[0032] 对比例 1

[0033] 本对比例提供一种血清 IgE 抗体的免疫层析法,基本同实施例 1,不同的是,其采用的免疫层析试纸条的结合垫结合的不是过敏原-生物素-亲合素-乳胶微球,而是结合了过敏原-乳胶微球。该过敏原-乳胶微球的制备过程如下:

[0034] 将过敏原溶于 100mM MES (pH 4.5) 中,得浓度达到 1mg/ml 的过敏原溶液。将微球储存液剧烈震荡 20s,取出 5.0×10^6 的微球于 Eppendorf 离心管中,以 8000g-10,000g 的转速离心 1-2min,除去上清,加入 50 μ l 100mM MES (pH 4.5),剧烈震荡 20s,加入 2 μ l 过敏原溶液,加入 2.5 μ l 新鲜配制的 10mg/ml 的 EDC,剧烈震荡,使其混合均匀。室温暗室孵育 30min,加入 1.0ml 0.02% 吐温-20,以 8000g-10,000g 的转速离心 1-2min,除去上清,得偶联的微球。将偶联的微球溶于 1.0ml 0.1%SDS 中,剧烈震荡,以 8000g-10,000g 的转速离心 1-2min,除去上清,使其溶于 100mM 的 PBS (pH 8.0),剧烈震荡 20s。

[0035] 对比上述的实施例 1 和对比例 1 的检测结果可知,对比例 1 的检测结果颜色非常暗淡,不容易观察,表明该方法灵敏度低;而实施例 1 的检测结果明显,容易观察,表明灵敏度高。

[0036] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种检测血液样本中过敏原特异性IgE抗体的免疫层析方法		
公开(公告)号	CN102565382B	公开(公告)日	2013-12-04
申请号	CN201210002623.3	申请日	2012-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	李冬冬 赵文姬 张逸南		
发明人	李冬冬 赵文姬 张逸南		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	汪青		
其他公开文献	CN102565382A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测血液样本中过敏原特异性 IgE 抗体的免疫层析方法，其首先将样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜、吸水垫依次相互交错粘贴在底板上，构成免疫层析试纸条，然后向样品垫中滴加血液样本进行检测，所述结合垫上结合有过敏原 - 生物素 - 亲合素 - 乳胶微球，该方法利用血液样本中的过敏原特异性 IgE 抗体能够与过敏原 - 生物素 - 亲合素 - 乳胶微球结合形成结合物，以及所形成的结合物能够在检测线处被捕获而呈现色带来实现对过敏原特异性 IgE 抗体的定性检测。本发明将生物素 - 亲合素系统应用于连接过敏原和乳胶微球，能够实现在一个过敏原上连接多个乳胶微球，从而使检测特异性 IgE 抗体的灵敏度提高，检测结果明显，容易观察。