

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/68 G01N 33/558

C12Q 1/68



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02137158.X

[43] 公开日 2004 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 1485619A

[22] 申请日 2002.9.26 [21] 申请号 02137158.X

[71] 申请人 缪金明

地址 201204 上海市浦东新区白杨路 360 弄 5  
号 1101 室

[72] 发明人 缪金明

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称 变应原（过敏原）蛋白芯片检测技术

[57] 摘要

本发明涉及一种变应原蛋白芯片检测技术，包括高通量荧光检测技术和低通量胶体金层析技术，是根据阵列固定变应原检测血清中 IgE 的原理设计的。高通量检测芯片可以同时测定血清中数个至数百特异性的 IgE 抗体，可应用于临床上过敏性疾病过敏原的筛查。特别是低通量胶体金层析技术，可以在 15 分钟内获得结果，不需特殊仪器设备，适宜于基层医院的普及检查。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种变应原蛋白芯片快速检测技术，包括高通量荧光检测技术和低通量胶体金层析技术，是根据阵列固定变应原检测血清中 IgE 的原理设计的，具体制作和检测过程如下：
  - A) 候选变应原的选择，及变应原浸液或变应原蛋白抗原的制备；
  - B) 变应原阵列设计和变应原固定，如是高通量检测方法，则采用修饰玻片和机器人点样技术，将变应原蛋白阵列于玻片表面；如是低通量检测方法，则采用多孔滤膜类材料和喷线或喷点方法制成多变应原层析检测膜条；
  - C) 高通量芯片的检测方法，是将芯片与被检血清孵育，让 IgE 与特异性的变应原结合，再用荧光物质标记的兔、羊、马等抗人 IgE 抗体与之反应，若被检血清中有相应的 IgE 存在，便在相应的变应原位点出现荧光信号；
  - D) 低通量胶体金层析检测方法，是预先将抗人 IgE 抗体包被的胶体金预置在层析膜条的一端的试剂垫，检测时将膜条的一端直接浸入被检样本血清，血清经层析效应流经胶体金试剂垫处使之复溶，并向变应原阵列线渗移，特异性 IgE 被俘获固定，出现红色沉淀。
  - E) 结果分析。
2. 根据权利要求 1 所描述的候选变应原的选择，其特征在于到目前为止的所有的变应原均可应用本发明的方法加以检测，变应原可以是可疑物质制备的变应原浸液，也可以是重组蛋白变应原，可根据需要选择其中一部分或任意组合制备变应原蛋白芯片。
3. 根据权利要求 1 所描述的变应原固定，其特征是将各种变应原直接阵列固定于修饰玻片或多孔滤膜表面。
4. 根据权利要求 1 和 3 所描述的变应原固定，其特征在于采用修饰玻片固定变应原，修饰玻片包括醛基修饰玻片、epoxy 修饰玻片以及硝酸纤维素膜包被的玻片。
5. 根据权利要求 1 和 3 所描述的多孔滤膜材料，其特征在于多孔滤膜材料具有液体层析渗移效应，这些滤膜包括硝酸纤维素膜、尼龙膜、PVDF 膜。
6. 根据权利要求 1 所描述的高通量检测方法，其特征在于固定的变应原的数量在 20 至 2500 个之间，以荧光物质标记的抗 IgE 抗体检测为主。
7. 根据权利要求 1 所描述的低通量胶体金层析检测方法，其特征在于一个检测膜条上固定 2 - 20 个变应原，以胶体金包被的抗 IgE 抗体检测为主。

## 变应原（过敏原）蛋白芯片检测技术

发明所属领域：生物领域

发明目的：提供高通量变应原快速筛选和检测技术。

本发明涉及一种变应原（过敏原）蛋白芯片快速检测技术，包括高通量荧光检测技术和低通量胶体金层析技术，是根据阵列固定变应原检测血清中 IgE 的原理设计的。高通量检测芯片可以同时测定血清中数个至数千特异性的 IgE 抗体，可应用于临床上过敏性疾病过敏原的筛查。特别是低通量胶体金层析技术，可以在 15 分钟内获得结果，不需特殊仪器设备，适宜于基层医院的普及检查。

变应原（Allergens）也称变态反应（Allergy）原或过敏原，是一类可以引发机体变态反应的外源性物质。而变态反应则是机体组织病理性损害的免疫反应。就是说，当机体再次接触同一抗原时，机体发生的反应不是保护性的免疫，而是不同形式的免疫病理损伤过程，甚至可以导致疾病的发生。

变应原大都是蛋白质性质，对于机体而言是属于外源性的蛋白质，对机体免疫系统具有致敏的作用，产生相应的 IgE 抗体（I 型变态反应）。当人体对某致敏物（变应原）产生变态反应后，机体免疫系统具有记忆效应，当该致敏物再次浸入时，便诱发变态反应。检测有无变态反应，只要检测致敏个体内有无相应的 IgE 存在就可以了。这种检测方法可以采用直接法或夹心法，固定变应原，然后根据蛋白质之间相互识别的原理检测血清中是否存在相应的 IgE 抗体。

变态反应的发生主要涉及两方面的因素：一为抗原物质（变应原）的性质；另一方面是机体对抗原的应答性（特异性，过敏体质）。变应原大都是含有蛋白质一类的物质，在室内外环境中经常能接触到的常有下列几种。

- (1) 吸入性变应原 常常是一种或几种微细的颗粒，如家禽或家畜身上皮屑、羊毛毯、绒线衫或羽绒衣上脱落的毳毛，花蕊中飘落的花粉、细菌、真菌尘螨等。尘螨个体极小，与灰尘混在一起，躲藏在木门窗或木椅桌的缝隙、沙发、枕头里，并可随灰尘到处飘扬，成为和哮喘病人缠绕在一起的“终身变应原”。
- (2) 摄入性变应原 是从口腔进入，例如牛奶、鸡蛋、鱼、虾、蟹及海鲜等。
- (3) 接触性变应原 是指某些日用化妆品，如美肤霜、护肤霜等，涂擦于皮肤吸收到体内也可引起过敏反应，轻者有接触性皮炎，重者亦可导致哮喘发作。

大约有 20% 以上的人患过过敏，其中 2~5% 必需去医院进行诊疗。在美国、日本和欧洲等国家，变应原的检测已相当普遍，已经作为变态反应性疾病的常规检测项目。但在我国，变应原的检测尚未得到应有的重视，而仍在采用传统的诊断模式，这并不利于临床上变态反应性疾病的及时确诊和治疗，也给病人带来额外的痛苦。现有变应原的诊断方法有 2 类：

1. 利用病人身体所做的检测

- 1) 刺皮试验 一般采用小针轻轻刺破前臂皮肤,并滴一滴含已知变应原的液体,可以很快看到结果。阳性结果为针刺部位红肿、皮丘。一般 15-20 分钟达到最大,几小时后褪去。过敏性皮炎多数采用该技术进行变应原筛查。
- 2) 斑贴试验 这种试验主要用于延缓型变态反应的诊断,如接触性皮炎等,测试方法是将被变应原以斑点的方式贴敷在皮肤上保持 48 小时。这类试验可以测试橡胶、镍金属、羊毛脂、染料、化妆品、溶剂、防腐剂以及药物等。
- 3) 激发试验 在医院,医生通常把怀疑的变应原拿来来进行直接激发试验,比如食物双盲试验,让病人吞服含有怀疑食品的胶囊,医生观察病人对食品的反应。这种试验只能在有指定专业医师和特定解除设备的情况下才可进行。

## 2. 体外血液学检验

- 1) 放射变应原吸附试验(RAST) RAST 是将纯化的变应原与固相载体结合,加入待检血清及参考对照,再与同位素标记的抗 IgE 抗体反应,然后测定固相的放射活性,通过标准曲线求出待检血清中特异性 IgE 的含量。
- 2) ELISA (酶联免疫吸附试验) 试验 酶联免疫测定法试验原理及步骤基本同 RAST,仅是最后加入酶标记的抗 IgE,利用酶底物进行显色。除了 ELISA 技术外,还有采用荧光检测的方法。ELISA 技术一般都是单个变应原的检测,要做完整的变应原筛选,需做几十个试验。

现有变应原检测技术存在以下不足:

- 1) 利用病人身体做变应原检测 利用病人身体做变应原检测仍然是临床在用的方法,这类方法存在效率低,需病人到现场,针刺疼痛、测试时间长、存在激发变态反应及交叉污染的可能等缺点。
- 2) 一次检测一个变应原 RAST 技术、ELISA 技术一般都是单个变应原的检测,要做完整的变应原筛选,需做几十个试验。目前虽有 96 孔微板格式的测试方法,可以同时测试 96 个病人,但对变应原筛选毫无帮助。
- 3) 操作烦琐 利用病人身体所做的测试,均存在操作烦琐的缺陷。
- 4) 操作费时 皮试试验、斑贴试验和体内激发试验,均需检测人员在现场相陪,监视整个检测过程和阳性结果的出现,特别是过敏原的超敏反应,可诱发严重的休克甚至致命,因此医生承担着很大的心里压力。
- 5) 检测成本高 由于现有方法均为单个变应原的检测,收费也高,若要进行多变应原的筛选,检测成本大幅上升。

本发明为了克服现有检测技术的缺陷和不足,采用高集成度的蛋白芯片检测技术,同时检测几十甚至几千个变应原,当采用高密度玻片构建高通量高集成蛋白芯片时,采用荧光标记技术,可以高灵敏地同时检测所有已知的变应原;当采用层析技术和胶体金标记技术时,可以实现快速的检测。具体实现方法如下:

### I. 高通量变应原蛋白芯片荧光检测方法

#### 1. 变应原浸液的制备

变应原浸液的制备,包括下列各项步骤:粉碎、净化、去脂、提取、过滤与分离、透析、浓缩、酸碱度的测定及校正、除菌过滤、分装、灭菌检查、毒性试验、标准化、贴标签及填写制备记录单、冷藏等步骤。以上步骤适用于所有变应原浸液的制备。但并非所有材料均一成不变地依上列程序处理。例如一些不含脂肪的材料(如蔬菜、水果等)则不需要去脂;颗粒细小的物质不需要再研磨或打碎。需要透析和浓缩的也只有少数制剂。

## 2. 重组变应原蛋白

变应原浸液的缺陷是其中含有许多杂蛋白,重组变应原蛋白可以克服这个缺陷。制备时将相应变应原 DNA(见附件)构建原核细胞表达质粒或真核细胞表达质粒,转染到大肠杆菌或哺乳动物细胞进行表达,采用一定的方法如 6×His 技术纯化变应原蛋白,用作芯片的探针之用。

## 3. 变应原阵列设计

现在明确能够引起变态反应的物质或蛋白质有 400 多种,氨基酸序列也已弄清。由于这是高通量蛋白芯片,可以根据变应原的来源情况以及本地区的流行病发生情况,决定选择变应原组合构建蛋白芯片。

使用纯化的变应原,可以提高实验的准确性和敏感性。若使用粗制变应原,其蛋白质含量应先测出。测定方法可采用微量凯氏定氮法,测出蛋白氮单位/毫升。可根据 100 000 个蛋白氮单位为 1 毫克氮,换算成每毫升变应原蛋白质含量(以微克计量)。绝大部分变应原均适用于本法。大多数变应原经冻干或干燥后,可保存数月不失其活性。

## 4. 变应原点样构建蛋白芯片

应用三维点样机器人点样法是将预先制备好的变应原,通过由阵列点样机(arrayer),准确、快速地将不同变应原样品定量点样于经过醛基修饰过的玻片或硅片上,再经封闭、漂洗、干燥等过程制成变应原蛋白芯片。点样的方式分两种,其一为接触式点样,即点样针直接与固相支持物表面接触,将变应原样品留在固相支持物上;其二为非接触式点样,即喷点,它是以压电原理将蛋白质样品通过毛细管直接喷至固相支持物表面。点样机器人有一套计算机控制三维移动装置、多个打印/喷印头、一个减震底座,上面可放内盛蛋白探针的多孔板(384 孔)和多个芯片。根据需要还可以有温度和湿度控制装置、针洗涤装置。打印/喷印针将探针从多孔板取出直接打印或喷印于芯片上。

标准化的变应原,1:50 稀释,一般用 50mM PBS 稀释即可。稀释后将变应原(3-10 $\mu$ l)加到微孔板内,启动点样机器人进行点样。高密度点样机(如 Cartesian Technology 公司的 MicroSys 5100 小型台式芯片工作站;PixSys 5500 PA Workstation)可以制造每平方厘米 2500 探针的芯片;而中密度点样机(喷印机)可以在每平方厘米上排列 400 个探针。为了防止点样的误差,一般每变应原需点样 2-3 次。

用于制作芯片的玻片必须特别清洁和平滑,表面包被醛基功能基团,能与蛋白质分子中的氨基基团反应形成稳定的共价键。玻片具有不浸润性,可以制作密度很高的蛋白芯片(2500 点/cm<sup>2</sup>),同时还可使反应体积降低到最小;玻片的荧光信号本底低,不会造成很强的背景干扰;玻

璃芯片可使用双荧光甚至多荧光杂交系统,可在一个反应中同时对两个以上的样本进行平行处理。

然而,玻片的缺点是表面结合的蛋白容量有限,蛋白质的活性不容易保持。S&S公司的CAST Slides(Cat.No.10484181)将 SuperCharge 正电荷尼龙膜附着在玻片上,这种特殊的玻片综合了尼龙膜的高亲和力和玻片刚性的优点,而 FAST Slides(Cat.No.10484182)则是在玻片表面包被一种硝酸纤维膜材料,能与蛋白质以非共价但是不可逆的方式结合。由于表面包被层的多孔性和厚度使单位面积的蛋白质结合能力比常规化学表面处理玻片要高得多,使得检测更加灵敏。适用的检测方法包括同位素检测、化学发光法和荧光检测--由于包被的多聚物有效降低对入射光的散射,FAST Slide 同样适合用激光共聚焦成像系统进行荧光扫描检测。

## 5. 芯片与血清的孵育

病人血清含有特定的抗变应原的 IgE 抗体,可以与芯片上相应的变应原结合,再应用荧光标记的兔、羊、马等抗人 IgE 抗体与之反应,若体内有相应的 IgE 存在,便在相应的变应原位点出现荧光。具体检测方法是:

- 1) 加待测血清。取待测血清和阴性参考血清,用 10%小牛血清 PBS-T (1000ml 含氯化钠 8.0g; 磷酸二氢钾 0.2g; 磷酸氢二钠 2.9g; 氯化钙 0.2g; Tween-20 0.5g;pH 7.4) 稀释成 1:20 浓度,加到芯片变应原探针区域,每片加 200 微升,于保湿盒内,37°C 下保温 1-2 小时。
- 2) PBS-T 洗芯片,每次 3 分钟,共 3 次。
- 3) 加结合物。取 FITC 标记的羊抗人 IgE 结合物,用 PBS-T 稀释成 1:200。然后加到芯片上,每片加 200 微升,于保湿盒内,37°C 下保温 1-2 小时。。
- 4) PBS-T 洗芯片,每次 3 分钟,共 3 次。
- 5) 晾干扫描。

## 6. 荧光扫描,结果报告。

采用激光扫描仪扫描,根据所标记的荧光物质,选择适当的波长,扫描。激光扫描技术,是目前最敏感也是最复杂的检测技术,需要昂贵的扫描仪(例如 ScanArray 5000),这些扫描仪具有很高的分辨率,可用于高密度蛋白芯片的检测。

## II. 多变应原快速层析芯片

在既定的环境下,比如一定的季节,常见的过敏原一般为数不是很多,前 20 个常见过敏原可以涵盖 95%的病人,因此,可以设计适用于不同季节、不同地区的变应原检测芯片。这类芯片可以采取层析技术进行快速检测,检测过程非常简单,不须任何专业训练,不需任何设备,整个检测过程可以在 15 - 30 分钟内完成。胶体金层析法是将多个试剂组合在一个约 6mm×70mm 的塑料板条(附图)上,成为单一试剂条,试剂条上端和下端分别粘贴吸水材料和玻璃纤维样本垫,免疫金复合物干片粘贴在近下端处,紧贴其上为硝酸纤维素膜条。硝酸纤维素膜条上有数个测试区,测试区包被有各种变应原,对照区包被有 IgE 的抗体。其制备、检测过程如下:

### 1. 变应原浸液的制备

根据不同的变应原材料，进行下列全部或部分步骤的操作：粉碎、净化、去脂、提取、过滤与分离、透析、浓缩、酸碱度的测定及校正、除菌过滤、分装、灭菌检查、毒性试验、标准化、贴标签及填写制备记录单、冷藏等步骤。

## 2. 膜条准备

采用 Millipore 公司的中等流速的硝酸纤维素滤膜。试剂垫、样本垫、吸收垫等均可采用 Millipore 或 Whatman 公司的产品。与玻片相比，膜的优点是蛋白亲和力强，检测技术成熟，通常无需另外修饰。硝酸纤维素膜、尼龙膜、PVDF 膜等都是带有微孔的滤膜，其孔径一般在  $0.45\mu\text{m}$  ~  $15\mu\text{m}$  左右，在显微镜下这种膜就是一个立体的纤维网络，可以结合更多的蛋白质探针，使检测更加灵敏。同时，这种多孔结构可使液体在其中进行自由扩散，当在膜的一端给以液体扩散压力时，液体将沿一定方向扩散，例如沿条状膜条的单方向扩散。因此硝酸纤维素膜及其他层析膜，既是立体的网络固定载体，又是层析的良好材料，是制作低密度层析蛋白芯片的最佳支撑载体。

## 3. 喷样

标准化的变应原，1:50 稀释，蛋白浓度 1-3mg/ml 左右，一般用 50mM PBS 稀释即可。稀释后将变应原（100 $\mu\text{l}$ ）加到喷样储液瓶内，应用微量喷膜机（BioDot），将变应原溶液喷线于膜的相应位置，喷膜的体积控制在 1 $\mu\text{l}/\text{cm}$ ，喷样结束后，室温真空抽干，或 37 $^{\circ}\text{C}$  干燥 2 小时，使抗体探针牢固地固定于硝酸纤维素膜的表面。喷样后的膜应保存于干燥和 4 $^{\circ}\text{C}$  环境。封闭时用 5% BSA 封闭液，于保湿盒内，37 $^{\circ}\text{C}$  下保温 1 小时。

标准层析膜条一般有 20-25mm 长，可以喷线 2-20 条，也可以进行喷点，密度较高，但制备效率显著降低。在膜的两端须设质量控制线。

## 4. 胶体金制备技术

制备方法胶体金的制备多采用还原法。将  $\text{HauCl}_4$  先配制成 0.01% 水溶液，取 100ml 加热至沸。搅动下准确加入 1.5ml 的 1% 柠檬酸三钠（ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）水溶液。继续加热煮沸 15 分钟。此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变灰色，续而转成黑色，随后逐渐稳定成红色。全过程约 2 ~ 3 分钟。冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积。

## 5. 胶体金标记羊抗人 IgE 抗体

用胶体金标记蛋白质，就是指蛋白质吸附到胶体金颗粒表面。胶体金表面带有负电荷，能与蛋白质的正电荷静电吸引而形成牢固的结合。由于这种结合主要是物理作用，所以不会引起蛋白质活性的改变。标记前，需确定胶体金与待标记蛋白质的比例和将 pH 值调节到标记蛋白质 IgG 的等电点或略高（pH8.0）。标记时，将待标记羊抗人 IgE 抗体 1mg 加 15ml 胶体金溶液（1 OD），混合，室温搅拌 15 分钟，加入 10mg BSA，混合 5 分钟，离心，再通过离心法或凝胶层析法纯化标记的羊抗人 IgE 抗体。

## 6. 切割与芯片装配

采用切割机将复合好的膜片切成所需的规格和形状，即成单人用检测试剂膜条。将单人份试剂膜条及干燥剂装入铝薄膜小袋并封闭。

## 7. 层析检测

测定时将膜条下端（附图）1 浸入被检液体标本中，由于层析效应，液体向

上端吸水纤维处 7 移动，流经胶体金试剂垫 2 处时使干片上的免疫金复合物（羊抗人 IgE 抗体 9 包被的胶体金颗粒 10）复溶，并带动其向膜条渗移。若标本中有待测特异性 IgE 抗体 11 存在，其时可与免疫金复合物之抗体 9 结合，此抗体复合物流至测试区 4 即被相应的固相变应原所浮获，在膜条上显出红色反应沉淀线。过剩的免疫金复合物继续前行，至参照区 5 与固相 IgE 抗体 11 结合，而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

## 8. ELISA 技术检测

其操作方法是，将纯化的变应原与固相载体结合，加入待检血清及参考对照，再与酶标记的抗 IgE 抗体反应，然后测定固相的酶底物生色反应，通过标准曲线求出待检血清中特异性 IgE 的含量。

## 9. 结果分析

此试验以胶体金等有色微粒作为标记物，减少了操作步骤，可以直接用肉眼观察结果，而试剂可以在室温长期保存。这样一来就简化成一个试剂，一步完成的快速诊断试验，试验的特异性与 ELISA 相同，敏感性接近 ELISA。胶体金免疫层析法的突出优点是敏感，特异，简便，快捷，不需要任何特殊的仪器设备。因此适合基层单位普遍使用，另外特别适用于急诊，可方便地立时得知检测结果。

### 本发明的优点：

本变应原检测蛋白芯片产品，则将需筛查的变应原制成阵列，多至数千个，因此一次检测可以得到几乎所有变应原的致敏信息。该产品特点是：

- A) 高通量测定：利用高密度蛋白芯片制作技术，可以一次同时检测所有已知甚至未知的变应原，其检测数量不受限制。
- B) 并行数据处理：通过一次检测得到的信息，可以进行数据处理，具有高度的可比性，避免了现有技术的多次检测出现的结果误差。
- C) 微型化：由于是高密度技术，所需的检测血清样本很少，100 $\mu$ l 血清可以完成所有变应原的检测。
- D) 定量测定：可以直接通过荧光扫描进行变应原的半定量。或用反射吸光度计对斑点颜色（胶体金层析方法）的强度进行测定，可得到半定量的结果，用于胶体金层析半定量的多种简便精确的专用仪器已有供应。
- E) 快速测定：胶体金层析检测多变应原(3-20 个)，可以在 15-30 分钟内得到结果。还可在同一装置上测试多个标本，以便于对常用检验作多份测定，这种形式也有利于定量，可同时作标准品对照。
- F) 分组测定：根据许多变应原相似性的原理，可以采用混合变应原分组定位，然后再应用特异变应原筛选阳性变应原，这种方法最适合采用胶体金技术分层检测，为临床提供更大的方便。

以下结合实例和附图说明本发明的操作方法。

附图. 变应原胶体金层析装置

1 样本垫（加样区）                      7 吸水垫

2	胶体金试剂垫	8	固定的变应原探针
3	硝酸纤维膜层析区	9	包被在胶体金表面的抗 IgE 抗体
4	测试区(固定各种变应原)	10	胶体金颗粒
5	对照区(固定有人 IgE)	11	人 IgE 抗体(对照)
6	支撑膜		

## 实例 1 花粉变应原的抽提

### 1. 花粉的收集及处理

- 1) 于授粉季节, 将花序采回实验室, 摊开在洁净的纸上晾晒, 花粉即逐渐脱落。榆、白蜡、胡桃、杨、桦木、桤木、栎等花序, 应先用清水洗去浮尘, 再摊开晾晒。在晾晒中至不断翻动, 促使尽快干燥。
- 2) 将干燥的花序放入高速组织捣碎机中打碎, 然后先用 3 号筛筛除颗粒较大的杂质, 再通过 7 号或 8 号筛, 筛出花粉。
- 3) 将落下的花粉收集一起, 通过 8 号或 9 号筛, 去除杂质;
- 4) 苯、甲苯、乙醚各去脂一次, 约 4—5 小时。乙醚用量以没过花粉 2—3 倍为宜。

### 2. 变应原浸液的制备方法

- 1) 去脂花粉按 1:25 比例加入碳酸氢盐—盐水提取液(Coca's solution, pH8.2; 1000ml 中含有氯化钠 2.5g; 碳酸氢钠 2.75g; 结晶酚 4.0g); 在 4°C 冰箱内提取 72 小时, 提取过程中每天振荡或搅拌 2 小时。
- 2) 常压过滤澄清液体, 如液体较粘稠, 可先使用离心法分离。再用常压过滤。
- 3) 用 1N HCl 调整 pH 至 7.0。
- 4) 经消毒蔡氏滤器除菌过滤后, 于无菌操作下分装于灭菌疫苗瓶中。
- 5) 抽取少量原液, 进行蛋白浓度测定, 一般应达到 1—3mg/ml 蛋白质。
- 6) 贴好标签, 打上批号, 填写好制备记录单, 放入 4°C 冰箱冷藏备用。

## 实例 2 尘螨变应原浸液的制备

螨是属于蛛形纲的一类微小动物, 大约有 5 万种之多。与变态反应有关的主要为麦食螨科(Pyroglyphidae)的尘螨属(Dermataphagoides Bogdanov)和嗜霉螨属(Euroglyphus Fain)。这几种螨都是强烈的变应原。螨体的各部分及其分泌物和排泄物等, 均可引起致敏。这些物质随着铺床、叠被、扫地时飞扬于空气中, 当被体质过敏的人吸入到支气管和毛细支气管中, 即引起发病。尘螨变应原活性部分分子量在 10000—60000 之间, 活性最强者为酸性蛋白, 分子量在 20000—50000 之间。

### 1. 尘螨的收集方法

- 1) 粉尘螨的繁殖高峰在每年的春秋 5 - 6 月初 9 - 10 月, 收集应在这两个季节内进行。从粮店、面粉厂的地面及腾空的米、面袋内收集下脚粉尘, 带回实验室。
- 2) 将粉尘过 2 号分样筛, 去除杂质; 再过 4 号分样筛, 去掉颗粒细小的粉尘。中间一层即为含螨粉尘。
- 3) 将上述含螨粉尘倒入平底搪瓷盒或饭盒内, 铺成薄层, 再用玻片将其理平。由于螨的活动破坏了粉尘光滑的表面, 出现小突起, 由此即可查出螨类, 并进行人工培养, 获得大量的纯螨材料。

### 2. 尘螨的处理方法

- 1) 丙酮灭活、清洗后, 用多层纱布滤除丙酮。留在纱布中的含螨材料, 涂片镜检, 以螨的含量在 80% 以上为合格。
- 2) 将经镜检合格的材料, 加入乙醚去脂一次 (约 4 小时), 即可密闭贮存备用。

### 3. 尘螨变应原浸液的制备方法

- 1) 取去脂尘螨干粉按 1:50 比例 (w/v) 加入碳酸氢盐 - 盐水提取液 (参见实例 1)。
- 2) 在冰箱内提取 72 小时。提取过程中, 每天振荡或搅拌 2 小时。
- 3) 常压过滤澄清液体。
- 4) 用 1N HCl 调整 pH 至 7.0。
- 5) 除菌过滤, 分装于无菌疫苗瓶中。
- 6) 抽取样品, 进行蛋白浓度测定。可采取 BCA 蛋白定量法, 最终蛋白浓度调节到 1 - 3mg/ml。
- 7) 贴好标签, 打上批号, 填写好制备记录单。
- 8) 冰箱冷藏备用。

## 实例 3 全变应原蛋白芯片制作与检测

### 1. 全变应原的材料

目前已知是蛋白质及氨基酸序列的变应原已超过 280 多种 (见附件)。

### 2. 全变应原的收集

参见实例 1 和实例 2 的变应原浸液制备。

### 3. 变应原制备

将被提取的材料按重量比容积(w/v)浸泡在相应的提取液内 48—72 小时。提取过程中每日搅拌或振荡 2 小时左右, 以促使材料中活性成分的浸出。

为避免微生物的侵袭, 在停止搅拌或振荡时, 应将材料放入冰箱冷藏。如放置室温下, 则需加防腐剂, 通常加入 0.1% 毫升甲苯即可。但在除菌过滤前, 应将提取材料中的甲苯去除干净, 方法可采用电扇吹拂, 促使其挥发。

为了将材料中的蛋白质尽可能地提取出来, 可应用反复提取法提取。方法是

将每次提取后的沉淀物，再加入少许提取液反复浸泡提取几次，直到被提取的材料中不再含有或仅含微量蛋白质为止。这可以根据提取液中不发生缩脲反应来识别；也可以根据用醋酸溶液酸化之后，加热时没有沉淀形成来识别。但进行反复摄取后获得的溶液，必须浓缩至第一次提取后所得到的浸液总量。例如屋尘经提取后，所得滤液为 500 毫升，再经反复提取，滤液总量必然要超过 500 毫升，但无论超过多少，最后要求均浓缩至 500 毫升。

#### 4. 变应原点样

芯片支撑物为醛基玻片。

将标准化的变应原 1:50 稀释，一般用 50mM PBS 稀释即可。稀释后将变应原 (3–10 $\mu$ l) 加到 384 微孔板内，启动点样机器人进行点样。高密度点样机 (如 MicroSys 5100 小型台式芯片工作站) 可以制造每平方米 2500 探针的芯片；而中密度点样机 (喷印机) 可以在每平方米上排列 400 个探针。为了防止点样的误差，一般每变应原需点样 2–3 次。

#### 5. 芯片封闭、保存

变应原全部点到玻片上以后，室温晾干，放置至少 2 小时，然后直接浸入 1% BSA (10mM PBS, pH 7.4) 液中半小时，冷蒸馏水冲洗、晾干，置于放置干燥剂的密封玻片盒内，4 $^{\circ}$ C 保存。用前取出，并在室温下使温度上升至室温，取出玻片，进行检测。

#### 6. 检测过程

- 1) 加待测血清。取待测血清和阴性参考血清，用含 10% 小牛血清 PBS-T (1000ml 含氯化钠 8.0g; 磷酸二氢钾 0.2g; 磷酸氢二钠 2.9g; 氯化钙 0.2g; Tween-20 0.5g; pH 7.4) 稀释成 1:20 浓度，加到芯片变应原探针区域，每片加 200 微升，于保湿盒内，37 $^{\circ}$ C 下保温 1–2 小时。
- 2) PBS-T 洗芯片，每次 3 分钟，共 3 次。
- 3) 加结合物。取 FITC 标记的羊抗人 IgE 结合物，用 PBS-T 稀释成 1:200。然后加到芯片上，每片加 200 微升，于保湿盒内，37 $^{\circ}$ C 下保温 1–2 小时。
- 4) PBS-T 洗芯片，每次 3 分钟，共 3 次。
- 5) 晾干扫描。

#### 7. 结果分析

根据羊抗人 IgE 抗体标记的荧光素类型，选择适当的激光波长，进行扫描。如 ScanArray 5000 的氩离子激光，选用波长 488 激光扫描。

### 实例 4 吸入类变应原蛋白层析芯片的制作与检测

#### 1. 常见吸入类变应原材料的收集

- 1) 常见室内变应原：猫毛发皮屑(Cat epithelium); 粉尘螨(D. farinae); 点青霉菌(Penicillium not.); 烟曲霉菌(Aspergillus fum); 交链孢霉菌(Alternaria tenuis); 狗毛发皮屑(Dog dander); 屋尘螨(D. pteonyssinus); 芽枝霉菌(Cladosporium); 蟑螂(Cockroach); 鹅毛(Goose feather)。
- 2) 常见花粉变应原：桦树(Birch); 杨树(Cottonwood); 柳树(Willow); 杞木(Alder); 榆树(Elm); 牧草(Timothy); 豚草(Ragweed); 野苣(Lam's Quarter);

藜草(Pigweed); 荨麻(Nettle)。

## 2. 变应原制备

参见实例 1 和实例 2。

## 3. 胶体金抗体包被

采用商用供应的胶体金溶液，颗粒直径为 20nm。标记前，需确定胶体金与待标记蛋白质的比例和将 pH 值调节到标记蛋白质 IgG（抗人 IgE）的等电点或略高(pH8.0)。标记时，将待标记羊抗人 IgE 抗体 1mg 加 15ml 胶体金溶液（1 OD），混合，室温搅拌 15 分钟，加入 10mg BSA，混合 5 分钟，离心，再通过离心法或凝胶层析法纯化标记的羊抗人 IgE 抗体。

## 4. 喷样

选用 Millipore 公司的中等流速的硝酸纤维膜。试剂垫、样本垫、吸收垫等均采用 Millipore 公司的产品。

标准化的变应原，1:50 稀释，蛋白浓度 1-3mg/ml 左右，一般用 50mM PBS 稀释即可。稀释后将变应原（100 $\mu$ l）加到喷样储液瓶内，应用微量喷膜机（BioDot），将变应原溶液喷线于膜的相应位置，喷膜的体积控制在 1 $\mu$ l/cm，喷样结束后，室温真空抽干，或 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时，使抗体探针牢固地固定于硝酸纤维素膜的表面。喷样后的膜应保存于干燥和 4 $^{\circ}$ C 环境。封闭时用 5% BSA 封闭液，于保湿盒内，37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。

标准层析膜条一般有 20-25mm 长，可以喷线 10-20 条，也可以进行喷点，密度较高，但制备效率显著降低。在膜的两端须设质量控制线。

## 5. 包装

变应原喷样结束后，先后贴上样本垫、胶体金试剂垫、吸水垫等后，采用切割机将复合好的膜片切成所需的规格和形状，制成完整的检测装置，然后将检测装置放置在干燥袋内。

## 6. 层析检测

病人血样（200 $\mu$ l）采集后，离心去除血细胞，收集血清进行下列层析检测。测定时将膜条下端（附图）1 浸入被检液体标本中，由于层析效应，液体向上端吸水纤维处 7 移动，流经胶体金试剂垫 2 处时使干片上的免疫金复合物（羊抗人 IgE 抗体 9 包被的胶体金颗粒 10）复溶，并带动其向膜条渗移。若标本中有待测特异性 IgE 抗体 11 存在，其时可与免疫金复合物之抗体 9 结合，此抗体复合物流至测试区 4 即被固相变应原所俘获，在膜上显出红色反应线条。过剩的免疫金复合物继续前行，至参照区 5 与固相 IgE 抗体 11 结合，而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

## 7. 结果分析

直接用肉眼即可判断结果，阳性者，在相应的变应原线上有红色物质沉积，同时控制线也为阳性反应。如果需要定量，可用胶体金专用检测仪读取数据，或将膜条置于一般扫描仪上扫描，让电脑进行相应的数据分析。

## 附件 已知序列的部分蛋白质过敏原

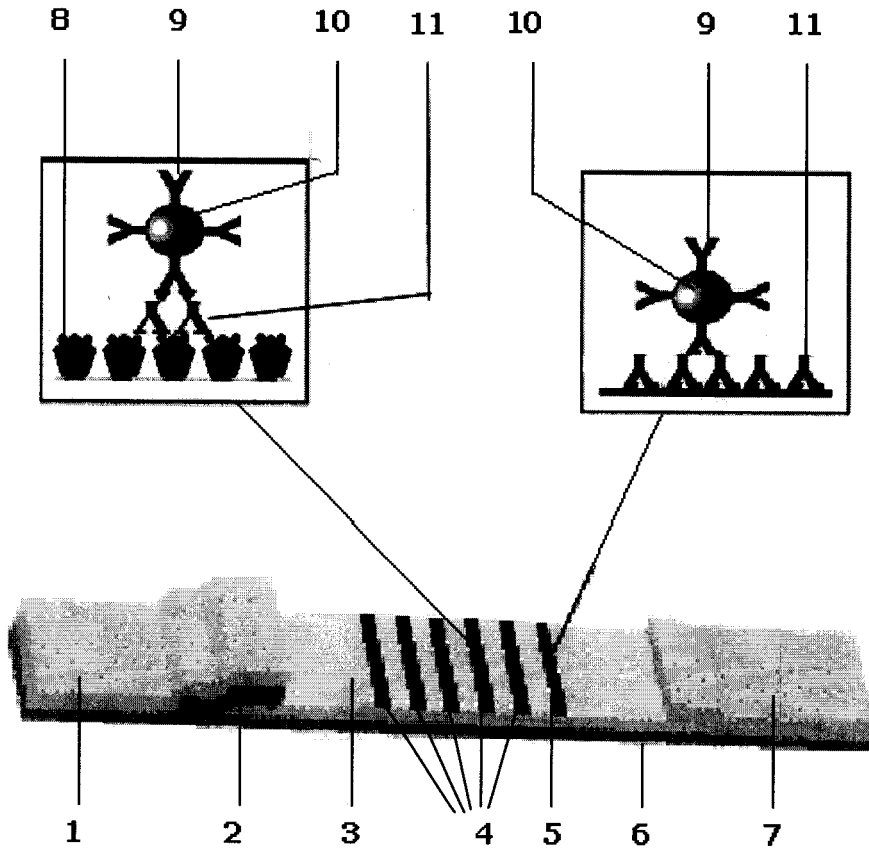
Allergen	SWISS-PROT entries
Aca s 13	FABP_ACASI (Q76821)
Act c 1	ACTN_ACTCH (P00785)
Aed a 1	APY_AEDAE (P50635)
Aed a 2	D7_AEDAE (P18153)
Aed a 3	ALL3_AEDAE (Q01949)
Aln g 1	MPAG_ALNGL (P38948)
Aln g 4	POC4_ALNGL (Q81701)
Alt a 1	ALA1_ALTAL (P79085)
Alt a 3	HS70_ALTAL (P78983)
Alt a 6	RLA2_ALTAL (P42037)
Alt a 7	ALA7_ALTAL (P42058)
Alt a 10	DHAL_ALTAL (P42041)
Alt a 11	ENO_ALTAL (Q9HDT3)
Alt a 12	RLA1_ALTAL (P49148)
Amb a 1	MP11_AMBAR (P27759), MP12_AMBAR (P27760), MP13_AMBAR (P27761), MP14_AMBAR (P28744)
Amb a 2	MPA2_AMBAR (P27762)
Amb a 3	MPA3_AMBEL (P00304)
Amb a 5	MPA5_AMBEL (P02878)
Amb a 6	NLT6_AMBAR (Q04004)
Amb p 5	MP5A_AMBPS (P43174), MP5B_AMBPS (P43175)
Amb t 5	MPT5_AMBTR (P10414)
Ani s 3	TPMM_ANISI (Q9NAS5)
Api g 1	ALL1_APIGR (P49372)
Api g 2	ALL2_APIGR (P92918)
Api g 3	CB23_APIGR (P92919)
Api g 4	PROF_APIGR (Q9XF37)
Api m 1	PA2_APIIME (P00630)
Api m 2	HUGA_APIIME (Q08169)
Api m 3	MEL_APIIME (P01501)
Ara h 1	AL11_ARAHY (P43237), AL12_ARAHY (P43238)
Ara h 5	PROF_ARAHY (Q9SQI9)
Ara t 8	PRO1_ARATH (Q42449)
Asp f 1	RNMG_ASPRE (P04389)
Asp f 2	ALL2_ASPFU (P79017)
Asp f 3	PM20_ASPFU (Q43099)
Asp f 4	ALL4_ASPFU (Q60024)
Asp f 6	SODM_ASPFU (Q92450)
Asp f 7	ALL7_ASPFU (Q42799)
Asp f 8	RLA2_ASPFU (Q9UUZ6)
Asp f 12	HS82_ASPFU (P40292)
Asp f 15	AL15_ASPFU (Q60022)
Ber e 1	2SS_BEREX (P04403)
Bet v 1	BV1A_BETVE (P15494), BV1B_BETVE (P45431), BV1C_BETVE (P43176), BV1D_BETVE (P43177), BV1E_BETVE (P43178), BV1F_BETVE (P43179), BV1G_BETVE (P43180), BV1J_BETVE (P43183), BV1K_BETVE (P43184), BV1L_BETVE (P43185), BV1M_BETVE (P43186)
Bet v 2	PROF_BETVE (P25816)
Bet v 3	ALL3_BETVE (P43187)
Bet v 4	POC4_BETVE (Q39419)
Bet v 7	CYPH_BETVE (P81531)
Bla g 4	BLG4_BLAG (P54962)
Bla g 5	GTS1_BLAG (Q18598)
Bla g II	ASP2_BLAG (P54958)
Blot 5	ALL5_BLOTA (Q96870)
Blot 12	BT12_BLOTA (Q17282)
Blot 13	FABP_BLOTA (Q17284)
Bom t 1	PA2_BOMTE (P82971)
Bos d 2	ALL2_BOVIN (Q28133)

Bos d 4	LCA_BOVIN (P00711)
Bos d 5	LACB_BOVIN (P02754)
Bos d 6	ALBU_BOVIN (P02769)
Bra j 1	ALL1_BRAJU (P80207)
Bra n 1	POC1_BRARA (Q42470)
Bra n 2	POC2_BRARA (Q39406)
Bra r 1	POC1_BRARA (Q42470)
Bra r 2	POC2_BRARA (Q39406)
Bra r 2	CHAL_BRARA (P81729)
Can a 1	ADH1_CANAL (P43067)
Can f 1	ALL1_CANFA (Q18873)
Can f 2	ALL2_CANFA (Q18874)
Can f 3	ALBU_CANFA (P49822)
Car b 1	MPA1_CARBE (P38949), MPA2_CARBE (P38950)
Cha f 1	TPM1_CHAFE (Q9N2R3)
Cha o 1	MPA1_CHAOB (Q96385)
Clah 3	DHAL_CLAHE (P40108)
Clah 3	RLA3_CLAHE (P42038)
Clah 4	HS70_CLAHE (P40918)
Clah 4	RLA4_CLAHE (P42039)
Clah 5	CLH5_CLAHE (P42059)
Clah 6	ENO_CLAHE (P42040)
Clah 12	RLA1_CLAHE (P50344)
Cop c 2	THIO_COPCM (Q9UW02)
Cor a 1	MPAA_CORAV (Q08407)
Cry j 1	SBP_CRYJA (P18632)
Cry j 2	MPA2_CRYJA (P43212)
Cte f 1	CTF1_CTEFE (Q94424)
Cup a 1	MPA1_CUPAR (Q9SCG9)
Cyn d 1	MPC1_CYNDA (Q04701)
Cyn d 7	POC7_CYNDA (P94092)
Cyn d 12	PROF_CYNDA (Q04725)
Dac g 2	MPG2_DACGL (Q41183)
Dac g 3	MPG3_DACGL (P93124)
Dac g 4	MPG4_DACGL (P82946)
Dau c 1	DAU1_DAUCA (Q04298)
Der f 1	MMAL_DERFA (P16311)
Der f 2	ALL2_DERFA (Q00855)
Der f 3	DEF3_DERFA (P49275)
Der f 6	DEF6_DERFA (P49276)
Der f 7	ALL7_DERFA (Q26456)
Der m 1	MMAL_DERMI (P16312)
Der p 1	MMAL_DERPT (P08176)
Der p 2	ALL2_DERPT (P49278)
Der p 3	DER3_DERPT (P39675)
Der p 4	AMY_DERPT (P49274)
Der p 5	ALL5_DERPT (P14004)
Der p 6	DER6_DERPT (P49277)
Der p 7	ALL7_DERPT (P49273)
Der p 8	GTM1_DERPT (P46419)
Der p 10	TPM_DERPT (Q18416)
Dola 5	VA5_DOLAR (Q05108)
Dola 1	PA11_DOLMA (Q06478), PA12_DOLMA (P53357)
Dola 2	HUGA_DOLMA (P49371)
Dola 5	VA52_DOLMA (P10736), VA53_DOLMA (P10737)
Equ c 1	ALL1_HORSE (Q95182)
Equ c 2	AL21_HORSE (P81216), AL22_HORSE (P81217)
Equ c 4	ALL4_HORSE (P82615)
Equ c 5	ALL5_HORSE (P82616)
Eur m 1	EUM1_EURMA (P25780)
Eur m 2	ALL2_EURMA (Q9TZ22)
Eur m 3	EUM3_EURMA (Q97370)
Fel d 1	FELA_FELCA (P30438), FELB_FELCA (P30439), FEL2_FELCA (P30440)
Fel d 2	ALBU_FELCA (P49064)

Fus s I3596	FUSS_FUSSO (P81010)
Gad c 1	PRVB_GADCA (P02622)
Gal d 1	IOVO_CHICK (P01005)
Gal d 2	OVAL_CHICK (P01012)
Gal d 3	TRFE_CHICK (P02789)
Gal d 4	LYC_CHICK (P00698)
Gly m 3	PRO1_SOYBN (O65809), PRO2_SOYBN (O65810)
Hel a 2	PROF_HELAN (O81982)
Hev b 1	REF_HEVBR (P15252)
Hev b 3	SRPP_HEVBR (O82803)
Hev b 5	ALL5_HEVBR (Q39967)
Hev b 6	HEVE_HEVBR (P02877)
Hev b 8	PRO1_HEVBR (O65812), PRO2_HEVBR (Q9STB6), PRO3_HEVBR (Q9M7N0), PRO4_HEVBR (Q9M7M9), PRO5_HEVBR (Q9M7M8), PRO6_HEVBR (Q9LEI8)
Hev b 9	ENO1_HEVBR (Q9LEJ0), ENO2_HEVBR (Q9LEI9)
Hol l 1	MPH1_HOLLA (P43216)
Hom a 1	TPM1_HOMAM (O44119)
Hor v 1	IAA1_HORVU (P16968)
Jun a 1	MPA1_JUNAS (P81294)
Jun a 3	PRR3_JUNAS (P81295)
Jun o 2	POC2_JUNOX (O64943)
Lep d 1	ALL1_LEPDS (P80384)
Lep d 5	ALL5_LEPDS (Q9U5P2)
Lep d 7	ALL7_LEPDS (Q9U1G2)
Lep d 10	TPM_LEPDS (Q9NFZ4)
Lep d 13	FABP_LEPDS (Q9U5P1)
Lig v 1	LIV1_LIGVU (O82015)
LoI p 1	MPL1_LOLPR (P14946)
LoI p 2	MPL2_LOLPR (P14947)
LoI p 3	MPL3_LOLPR (P14948)
LoI p 5	MP5A_LOLPR (Q40240), MP5B_LOLPR (Q40237)
Mal d 1	MAL1_MALDO (P43211)
Mal d 3	NLTP_MALDO (Q9M5X7)
Mal d 4	PRO1_MALDO (Q9XF40), PRO2_MALDO (Q9XF41), PRO3_MALDO (Q9XF42)
Mal f 1	MLF1_MALFU (Q01940)
Mal f 2	MLF2_MALFU (P56577)
Mal f 3	MLF3_MALFU (P56578)
Mer a 1	PROF_MERAN (O49894)
Met e 1	TPM1_METEN (Q25456)
Mus m 1	MUP6_MOUSE (P02762)
Myr p 1	MYR1_MYRPI (Q07932)
Myr p 2	MYR2_MYRPI (Q26464)
Ole e 1	ALL1_OLEEU (P19963)
Ole e 2	PRO1_OLEEU (Q24169), PRO2_OLEEU (Q24170), PRO3_OLEEU (Q24171)
Ole e 3	POC3_OLEEU (O81092)
Ole e 4	ALL4_OLEEU (P80741)
Ole e 5	SODC_OLEEU (P80740)
Ole e 6	ALL6_OLEEU (Q24172)
Ole e 7	ALL7_OLEEU (P81430)
Ole e 8	ALL8_OLEEU (Q9M7R0)
Ory s 1	MPO1_ORYSA (Q40638)
Pan s 1	TPM1_PANST (O61379)
Par j 1	NL11_PARJU (P43217), NL12_PARJU (Q04404), NL13_PARJU (Q40905)
Par j 2	NL21_PARJU (P55958), NL22_PARJU (Q04403)
Par j 3	PRO1_PARJU (Q9XG85), PRO2_PARJU (Q9T0M8)
Pen c 19	HS70_PENCI (Q92260)
Per a 3	CRPI_PERAM (Q25641)
Per a 7	TPM_PERAM (Q9UB83)

Pha a 1	MPA1_PHAHQ (Q41260)
Pha a 5	MP51_PHAHQ (P56164), MP52_PHAHQ (P56165), MP53_PHAHQ (P56166), MP54_PHAHQ (P56167)
Phl p 1	MPP1_PHLPR (P43213)
Phl p 2	MPP2_PHLPR (P43214)
Phl p 5a	MP5A_PHLPR (Q40962)
Phl p 5b	MP5B_PHLPR (Q40963)
Phl p 6	MPP6_PHLPR (P43215)
Phl p 7	POC7_PHLPR (O82040)
Phl p 11	PRO1_PHLPR (P35079), PRO2_PHLPR (Q24650), PRO3_PHLPR (Q24282)
Poa p 9	MP91_POAPR (P22284), MP92_POAPR (P22285), MP93_POAPR (P22286)
Pol a 1	PA1_POLAN (Q9U6W0)
Pol a 2	HUGA_POLAN (Q9U6V9)
Pol a 5	VA5_POLAN (Q05109)
Pol d 5	VA5_POLDO (P81656)
Pol e 5	VA5_POLEX (P35759)
Pol f 5	VA5_POLFU (P35780)
Pru ar 1	PRU1_PRUAR (Q50001)
Pru ar 3	NLT1_PRUAR (P81651)
Pru av 1	PRU1_PRUAV (Q24248)
Pru av 3	NLTP_PRUAV (Q9M5X8)
Pru av 4	PROF_PRUAV (Q9XF39)
Pru d 3	NLT1_PRUDO (P82534)
Pru p 3	NLT1_PRUPE (P81402)
Pyr c 1	PYR1_PYRCO (O65200)
Pyr c 3	NLTP_PYRCO (Q9M5X6)
Pyr c 4	PROF_PYRCO (Q9XF38)
Rat n 1	MUP_RAT (P02761)
Ric c 1	2SS_RICCO (P01089)
Sal s 1	PRV1_SALSA (Q91482), PRV2_SALSA (Q91483)
Sin a 1	ALL1_SINAL (P15322)
Sola t 2	ICTD_SOLTU (P16348)
Sola t 4	IAP2_SOLTU (P30941)
Sol g 4	VA4_SOLGE (Q9NH75)
Sol i 2	VA2_SOLIN (P35775)
Sol i 3	VA3_SOLIN (P35778)
Sol i 4	VA4_SOLIN (P35777)
Sol r 2	VA2_SOLRI (P35776)
Sol r 3	VA3_SOLRI (P35779)
Syr v 3	POC3_SYRVU (P58171)
Tyr p 2	ALL2_TYRPU (Q02380)
Ves f 5	VA5_VESFL (P35783)
Ves g 5	VA5_VESGE (P35784)
Ves m 1	PA1_VESMC (P51528)
Ves m 5	VA5_VESMC (P35760)
Ves p 5	VA5_VESPE (P35785)
Ves s 5	VA5_VESSQ (P35786)
Ves v 1	PA1_VESVU (P49369)
Ves v 2	HUGA_VESVU (P49370)
Ves v 5	VA5_VESVU (Q05110)
Ves vi 5	VA5_VESVI (P35787)
Vesp c 5	VA51_VESCR (P35781), VA52_VESCR (P35782)
Vesp m 5	VA5_VESMA (P81657)
Zea m 1	EXBA_MAIZE (P58738), EXBB_MAIZE (Q07154)
Zea m 14	NLTP_MAIZE (P19656)

附图.



专利名称(译)	变应原 ( 过敏原 ) 蛋白芯片检测技术		
公开(公告)号	<a href="#">CN1485619A</a>	公开(公告)日	2004-03-31
申请号	CN02137158.X	申请日	2002-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	缪金明		
申请(专利权)人(译)	缪金明		
当前申请(专利权)人(译)	缪金明		
[标]发明人	缪金明		
发明人	缪金明		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/558 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种变应原蛋白芯片检测技术，包括高通量荧光检测技术和低通量胶体金层析技术，是根据阵列固定变应原检测血清中IgE的原理设计的。高通量检测芯片可以同时测定血清中数个至数百特异性的IgE抗体，可应用于临床上过敏性疾病过敏原的筛查。特别是低通量胶体金层析技术，可以在15分钟内获得结果，不需特殊仪器设备，适宜于基层医院的普及检查。

