



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253199 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110158650. 5

(22) 申请日 2011. 06. 14

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 高其康 吴善东 楼兵干 赵钺钺

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测血清中过敏原特异性抗体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测血清中过敏原特异性抗体的方法,包括:将抗人 IgE 抗体与表面羧基修饰的磁性微球偶联,制得免疫磁性微球;将免疫磁性微球与待测血清混合孵育,使免疫磁性微球与待测血清中的 IgE 结合;磁分离得到免疫磁性微球-IgE 结合物,将沉淀溶于缓冲液,加入到包被有过敏原的酶标板孔内,经孵育、洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。本发明方法通过磁性微球偶联抗人 IgE 抗体,制得的免疫磁性微球与待测血清混合孵育,与血清中所有 IgE 结合,富集并分离 IgE,接着利用酶联免疫吸附法进行检测,判定血清当中是否含有与过敏原结合的特异性 IgE。本发明通过免疫磁性微球将所有 IgE 从血清中分离出来,去除了杂质,提高了酶联免疫吸附检测的灵敏度、特异性和准确性。

1. 一种检测血清中过敏原特异性抗体的方法,包括:

将抗人 IgE 抗体与表面羧基修饰的磁性微球偶联,制得免疫磁性微球;将免疫磁性微球与待测血清混合孵育,使免疫磁性微球与待测血清中的 IgE 结合;磁分离得到免疫磁性微球-IgE 结合物,并分散于缓冲液中,加入到包被有过敏原的酶标板孔内,孵育、洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述表面羧基修饰的磁性微球通过如下方法制备:

将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸和尿素溶于乙二醇中,在 $180 \sim 220^\circ\text{C}$ 下加热 $4 \sim 8$ 小时,分离沉淀,洗涤,即制得表面羧基修饰的磁性微球。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫磁性微球与待测血清的重量体积比为 $10 \mu\text{g} : 10 \mu\text{L} \sim 1\text{mL}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的磁性微球与抗人 IgE 抗体偶联前经交联剂活化。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述交联剂为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,每毫克磁性微球偶联的抗人 IgE 抗体的质量为 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 。

检测血清中过敏原特异性抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及诊断技术领域,尤其涉及一种检测血清中过敏原特异性抗体的方法。

背景技术

[0002] 过敏性疾病的发病在现代社会中呈逐年上升的趋势,我国大约有 5-10%、美国和欧洲等发达国家大约有 5-25% 的人受过敏性疾病的困扰。过敏反应又称变态反应,是人类常见的免疫性疾病。但其会引起一系列的临床反应,涉及到胃肠道、皮肤、呼吸道甚至更危险的其它反应,故应该引起足够的重视。诱发过敏反应的抗原称为过敏原,引起过敏反应的抗原物质常见的有 2000 多种,医学文献记载接近 2 万种。过敏原可根据其引起过敏的方式分为 3 类:(1) 食物过敏,由食用某些食物引起的,如牛奶、蛋类、鱼虾等;(2) 吸入性过敏,由鼻腔等吸入某些物质引起的,如花粉、尘螨等;(3) 接触性过敏,由于身体接触到某些物质引起的,如化妆品、橡胶制品等。免疫介导的过敏反应有两种类型:IgE 介导的过敏反应和非 IgE 介导的过敏反应。IgE 介导的过敏反应是引起过敏的主要效应。

[0003] 目前,IgE 介导的过敏反应的过敏原的检测在临床上已有多种检测方法。可分为体内检测方法和体外检测方法。体内检测包括双盲对照食物激发实验(DBPCFC)和皮肤点刺试验(SPT)。体内试验虽然简单、快速,但对试验者造成创伤和极大痛苦,且受多因素影响。相对于体内实验,体外实验更加安全,体外检测方法主要包括对血清 IgE 的检测和组织胺释放试验等。过敏原与 IgE,尤其是特异性 IgE(sIgE)的结合是过敏原致敏的中心环节,因此提高过敏原特异性 IgE 检测的准确性和灵敏度对过敏原的评价和临床过敏症的诊断具有重要意义。IgE 介导的过敏反应的致敏过敏原检测方法有多种,如放射过敏原吸附试验(RAST)、酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫印迹等。针对酶免疫分析已经有多种检测产品,如测定帽(CAP)过敏原检测系统、德国 MEDIWISS 公司生产的 AllergyScreen 系统及美国 ASI 公司生产的过敏反应体外检测系统等,但这些方法的仪器试剂都很昂贵,不适于普及应用。

[0004] 纳米超顺磁性微球是利用纳米技术制备出来的一种内含磁性材料纳米粒子的高分子微球。在外部磁场作用下,纳米超顺磁性能迅速从所在的溶液介质中定向移至磁场作用区,撤去外部磁场,纳米超顺磁性微球又可重悬浮于溶液介质中。同时磁性微球表面通过化学反应形成多种活性功能集团,如 -OH, -COOH, -CHO, -NH₂ 等,从而可以共价方式结合具有生物活性的物质,如蛋白,核酸等生物载体。再有纳米级尺度使微球比表面积激增,微球官能团密度及选择性吸收能力变大,达到吸附膨胀的时间缩短,粒子的稳定性大大提高。基于超顺磁性微球的这些特点,其逐渐在生物学、生物技术和生物医学领域得到广泛应用,主要应用于分离浓缩等试验。利用磁性微球比表面积大,易分离,表面可功能化等优点将其用于免疫测定,由于磁性微球代替了其它固相载体而用于免疫分离,与传统方法相比,该方法具有特异性好,灵敏度高,准确性好的特点。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种检测血清中螨虫过敏原特异性抗体的方法,解决了传统方法灵

敏度和准确性不高的问题。

[0006] 一种检测血清中螨虫过敏原特异性抗体的方法,包括:

[0007] 将抗人 IgE 抗体与表面羧基修饰的磁性微球偶联,制得免疫磁性微球;将免疫磁性微球与待测血清混合孵育,使免疫磁性微球与待测血清中的 IgE 结合;磁分离得到免疫磁性微球-IgE 结合物,将沉淀溶于缓冲液,加入到包被有过敏原的酶标板孔内,经孵育、洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。

[0008] 所述磁性微球的制备方法如下:

[0009] 将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸和尿素溶于乙二醇中,在 $180 \sim 220^\circ\text{C}$ 下加热 $4 \sim 8$ 小时,分离沉淀,洗涤,即制得磁性微球。

[0010] 所述免疫磁性微球与待测血清的重量体积比为 $10 \mu\text{g} : 10 \mu\text{L} \sim 1\text{mL}$ 。

[0011] 所述的磁性微球与抗人 IgE 抗体偶联前经交联剂活化,所述活化所用试剂为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液。

[0012] 优选的,每毫克磁性微球偶联的抗人 IgE 抗体的质量为 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 。

[0013] 所述的包被有过敏原的酶标板中的过敏原可以是各种能引起人类过敏的蛋白。

[0014] 本发明方法通过磁性微球偶联抗人 IgE 抗体,制得的免疫磁性微球与待测血清混合孵育,与血清中所有 IgE 结合,接着在外界磁场的作用下分离免疫磁性微球-IgE 结合物,结合包被有过敏原的酶标板,利用酶联免疫吸附法进行检测,判定血清当中是否含有与相应过敏原结合的特异性 IgE。本发明通过免疫磁性微球将所有 IgE 从血清中分离出来,去除了杂质,提高了酶联免疫吸附检测的灵敏度、特异性和准确性。

附图说明

[0015] 图 1 为实施例 1 羧基修饰的 Fe_3O_4 磁性微球的扫描电镜图;

[0016] 图 2 为实施例 3 本发明方法与传统方法检测螨虫特异性抗体的结果示意图;

[0017] 图 3 为实施例 4 酶联免疫吸附检测所得 OD 值随血清稀释倍数变化关系图;

[0018] 图 4 为实施例 5 酶联免疫吸附检测所得 OD 值与血清中 IgE 含量关系图。

具体实施方式

[0019] 实施例 1

[0020] 将 5mmol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 3mmol 柠檬酸和 20mmol 尿素溶于 20mL 乙二醇溶剂中,混合溶液置于 30mL 水热釜中,在 200°C 下加热 6 小时,所得黑色沉淀分别用乙醇和去离子水洗涤 3 次,溶于去离子水中并加入 0.02% (w/v) 的叠氮化钠长期保存,制得如图 1 所示粒径大小约为 200nm ,表面小分子羧基修饰的亲水性单分散 Fe_3O_4 磁性微球。

[0021] 实施例 2

[0022] 偶联羊抗人 IgE 抗体,制备免疫磁性微球。

[0023] (1) 使用 25mM MES ($\text{pH} = 6$) 为缓冲液,取 $9 \mu\text{L}$ 、 $15 \mu\text{L}$ 、 $30 \mu\text{L}$ 、 $90 \mu\text{L}$ 磁性微球 (浓度为 10mg/mL),清洗两次,旋转混合 10min ;

[0024] (2) 使用新鲜配制的 EDC 和 NHS 溶液为交联剂,EDC 和 NHS 的浓度为 50mg/mL ,溶剂为 25mM MES ($\text{pH} = 6$),向清洗后的磁性微球各加入交联剂,每 mg 磁性微球各加入 $20 \mu\text{L}$

交联剂,室温下倾斜旋转孵育 30min,活化磁性微球;

[0025] (3) 活化后的磁性微球用 MES 缓冲液清洗两次,加入 24 μ L 羊抗人 IgE 抗体 (2.5mg/mL),继续加入 6 μ LMES,漩涡混合,室温下旋转温育 1-2h;

[0026] (4) 孵育后,磁分离,移除上清于一新管中(留作测偶联率);偶联率(%)=(偶联前的单抗浓度-偶联后的上清浓度) $\times$ 100/偶联前的单抗浓度;

[0027] (5) 清洗偶联抗体后的磁性微球,用 0.05M Tris.HCl(pH=7.4)阻断未反应的磁性微球表面的羧基,室温下旋转温育 15min,PBST 缓冲液清洗 4 次,此缓冲液为含 0.5% (w/v)Tween-20 的 PBS(pH=7.4);

[0028] (6) 10%牛血清白蛋白(BSA)溶液室温下震荡封闭 24h。按照上述方法,磁性微球偶联抗体后上清的抗体含量极低,偶联率均接近 100%(表 1),说明由水热法制备的 200nm 磁性微球的羧基含量较高;当磁性微球用量已经很低时,仍可偶联较高浓度的抗体。

[0029] 表 1

	磁性微球与抗体			
	的质量比例	吸光值 A	蛋白质浓度	偶联率
[0030]	15:1	0.003	4.72 μ g/ml	99.80%
	5:1	0.005	7.42 μ g/ml	99.70%
	2.5:1	0.007	10.13 μ g/ml	99.60%
	1.5:1	0.006	8.78 μ g/ml	99.60%

[0031] 实施例 3

[0032] 用实施例 2 制备的 200nm 免疫磁性微球(15:1)捕获血清样品中的特异性 IgE 抗体,分析利用免疫磁性微球的方法对螨虫特异性 sIgE 的检测效果。具体操作如下:

[0033] 根据需求量取免疫磁性微球于干净的离心管中,按照体积比 1:10 的比例(10 μ L 免疫磁性微球加 100 μ L 活化缓冲液)加入缓冲液,混匀。磁分离,移除缓冲液。如此再次清洗一次,然后加活化缓冲液定容至原需求量。

[0034] 将待测的含有螨虫特异性 IgE(sIgE)的血清样品,分别稀释 1 倍、3 倍、5 倍、10 倍、100 倍、1000 倍,备用。在离心管中各加入 2 μ L 活化后的免疫磁性微球(浓度为 5mg/mL),再加入 100 μ L 上述待测血清样品,混匀,于室温下旋转孵育 15-20min。孵育后,磁分离,移除上清;加入 PBS 缓冲溶液至 100 μ L,混匀得免疫磁性微球 IgE 样品。

[0035] 然后使用杭州浙大迪讯生物基因工程有限公司的产品(产品标准编号(YZB/国 1736-2009)),参照其过敏原特异性抗体 IgE 检测试剂盒说明书进行酶联免疫法检测 OD 值,具体操作步骤如下:

[0036] (1) 在特异性过敏原孔中加入 100 μ L 上述温育混匀后的免疫磁性微球 IgE 样品,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 45min;

[0037] (2) 洗板:倒尽板内液体,每孔加入 250 μ L 稀洗涤液洗涤酶标板,然后倒尽液体,再加入 250 μ L 稀洗涤液,倒尽液体,如此反复洗涤 5 次,最后将酶标板翻扣在厚叠吸水纸上拍干;

[0038] (3) 每孔分别加入 100 μ L 已经配制好的 HR 酶联二抗溶液,37 $^{\circ}$ C 温育反应 45min;

[0039] (4) 洗板:如步骤(2)操作;

[0040] (5) 每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液,室温避光静置反应 15-20min;

[0041] (6) 每孔分别加入 100 μ L 终止反应液；

[0042] (7) 使用标准酶标仪在 450nm 波长下测出每孔的吸光度值 (OD 值)。

[0043] 按照上述操作方法,每一试验结果都来自 3 个重复的平均值。以酶联免疫法直接对血清样品进行检测的 OD 值作为对照,用 200nm 免疫磁性微球检测了对螨虫过敏的不同浓度待测血清样品。结果表明 (图 2),免疫磁性微球检测的 OD 值均高于常规方法直接检测的 OD 值,其中以稀释 5 倍时最高,此时的 sIgE 浓度约为 0.5IU/mL。

[0044] 实施例 4

[0045] 免疫磁性微球捕获血清样品中的特异性 IgE 抗体,将待测血清样品分别稀释至原体积的 1 倍、2 倍、3 倍、5 倍和 10 倍,通过检测免疫磁性微球与待测血清样品混合时,可以有效捕获的血清样品中 IgE 抗体的最大反应体积,分析免疫磁性微球捕获法的检测灵敏度。具体操作如下：

[0046] 活化免疫磁性微球：根据需求量,取上述实施例 2 制备的 200nm 免疫磁性微球 (15 : 1) 于干净的离心管中,按照体积比 1 : 10 的比例 (10 μ L 免疫磁性微球加 100 μ L 活化缓冲液) 加入含 0.1% BSA 的 PBS 活化缓冲液,混匀。磁分离,移除缓冲液。如此再次清洗一次,然后加活化缓冲液定容至原需求量。

[0047] 样品的孵育：在离心管中各加入 100 μ L 含有户尘螨特异性 IgE (sIgE) 的待测血清样品,再分别稀释至原体积的 1 倍、2 倍、3 倍、5 倍、10 倍。分别取 2 μ L 上述活化后的免疫磁性微球 (浓度为 5mg/mL) 到离心管中,轻轻混匀,室温下旋转孵育 15-20min;孵育结束后,磁分离,移除上清;加入 100 μ L PBS 缓冲液,混匀。然后用酶联免疫法检测 OD 值,具体操作步骤同实施例 3。

[0048] 按照上述操作方法,每一试验结果都来自 3 个重复的平均值。结果表明 (图 3),在 IgE 总量一定的情况下,待测样品的体积扩大至常规检测方法的 3 倍时,检测灵敏度不受影响;随着体积的进一步扩大,检测值有所下降,扩大为 10 倍时,趋近于常规方法的检测值。

[0049] 实施例 5

[0050] (1) 免疫磁性微球的清洗活化：根据需求量,取上述实施例 2 制备的免疫磁性微球 (15 : 1) 于干净的离心管中,按照体积比 1 : 10 的比例加入含 0.1% BSA 的 PBS 活化缓冲液,混匀。磁分离,移除缓冲液。如此再次清洗一次,然后加上述活化缓冲液定容至原需求量。

[0051] (2) 样品孵育：根据国际分级标准,标准血清样品稀释浓度为 0.35IU/mL、0.7IU/mL、3.5IU/mL、17.5IU/mL、50IU/mL、100IU/mL。分别取 2 μ L 活化后的免疫磁性微球加到酶标板的各孔中,再各加入将上述浓度梯度稀释 10 倍的标准血清样品,终体积为 100 μ L,轻轻混匀;室温下振荡孵育 15-20min。

[0052] (3) 洗板：磁分离,移除上清,每孔加入 200 μ L PBST 缓冲液洗涤酶标板,磁分离后,移除上清,如此反复洗涤 3 次,最后将洗涤液完全移除干净。

[0053] (4) 每孔分别加入 100 μ L 已经配制好的 HRP 酶联二抗,吸打或者轻轻摇晃,与免疫磁性微球混匀,37℃温育 45min。

[0054] (5) 洗板：如步骤 (2) 操作。

[0055] (6) 每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液,吸打或者轻轻摇晃,与免疫磁性微球混匀,室温避光静置反应 15-20min。

[0056] (7) 每孔分别加入 100 μ L 终止反应液。

[0057] (8) 使用标准酶标仪在 450nm 波长下测出每孔的吸光度值 (OD 值)。

[0058] (9) 结果计算 :以标准溶液系列的吸光度值 (OD 值) 对相应浓度的对数值进行线性回归,计算出校准曲线。

[0059] 如图 4 所示,标准曲线在 IgE 浓度为 0.035IU/mL $\sim$ 10IU/mL 之间线性关系良好, $R^2 = 0.9606$,相关系数较好。

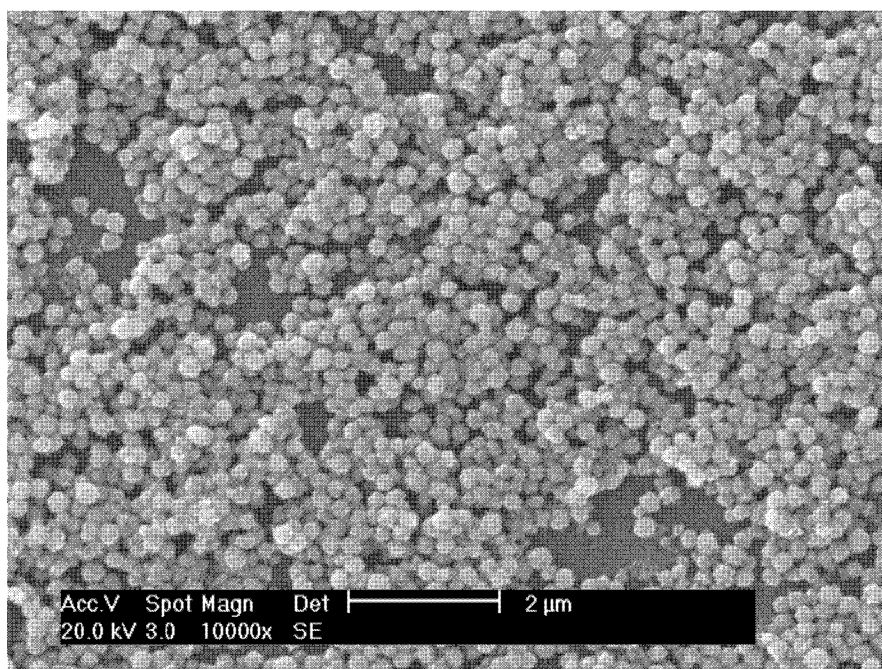


图 1

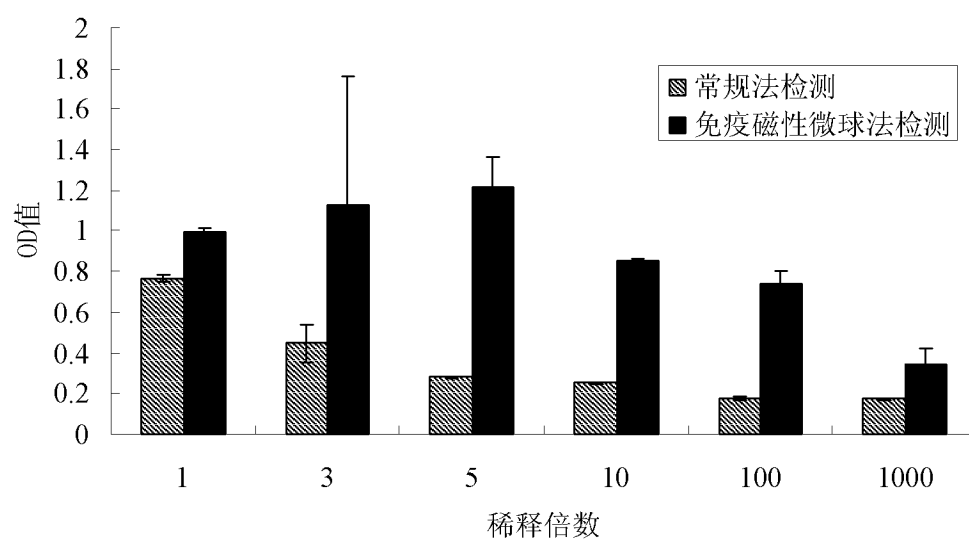


图 2

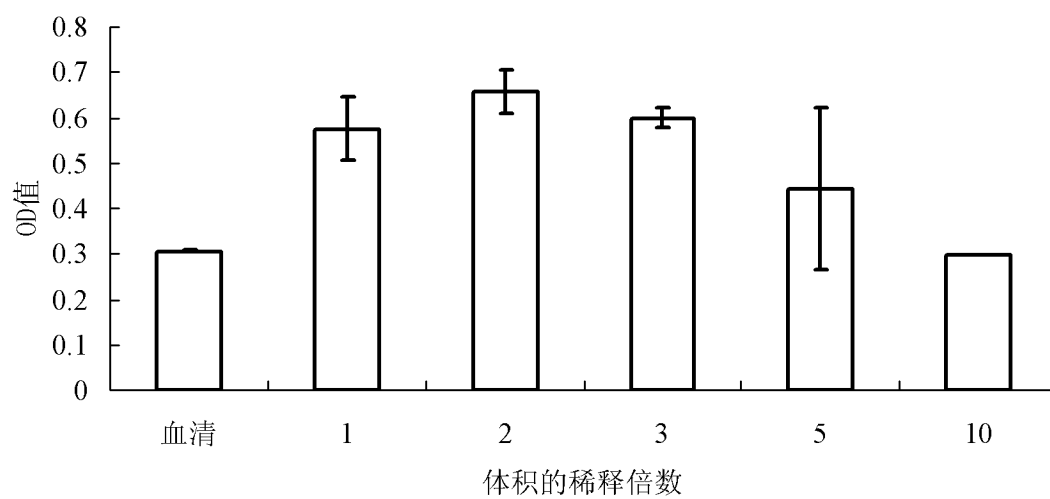


图 3

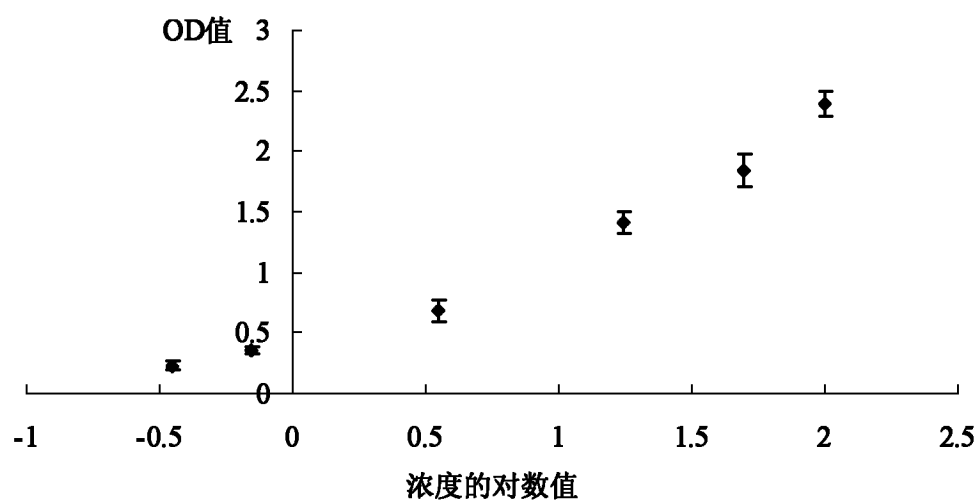


图 4

专利名称(译)	检测血清中过敏原特异性抗体的方法		
公开(公告)号	CN102253199A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201110158650.5	申请日	2011-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	高其康 吴善东 楼兵干 赵铨铨		
发明人	高其康 吴善东 楼兵干 赵铨铨		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	胡红娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测血清中过敏原特异性抗体的方法，包括：将抗人IgE抗体与表面羧基修饰的磁性微球偶联，制得免疫磁性微球；将免疫磁性微球与待测血清混合孵育，使免疫磁性微球与待测血清中的IgE结合；磁分离得到免疫磁性微球-IgE结合物，将沉淀溶于缓冲液，加入到包被有过敏原的酶标板孔内，经孵育、洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。本发明方法通过磁性微球偶联抗人IgE抗体，制得的免疫磁性微球与待测血清混合孵育，与血清中所有IgE结合，富集并分离IgE，接着利用酶联免疫吸附法进行检测，判定血清当中是否含有与过敏原结合的特异性IgE。本发明通过免疫磁性微球将所有IgE从血清中分离出来，去除了杂质，提高了酶联免疫吸附检测的灵敏度、特异性和准确性。

磁性微球与抗体的质量比例			
吸光值 A	蛋白质浓度	偶联率	
15:1	0.003	4.72μg/ml	99.80%
5:1	0.005	7.42μg/ml	99.70%
2.5:1	0.007	10.13μg/ml	99.60%
1.5:1	0.006	8.78μg/ml	99.60%