

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810060570.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月3日

[11] 公开号 CN 101256186A

[22] 申请日 2008.3.28

[21] 申请号 200810060570.4

[71] 申请人 杭州浙大生科生物技术有限公司

地址 310013 浙江省杭州市西湖区玉古路 116  
号 2 楼 204 室

[72] 发明人 吴善东

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 韩介梅

权利要求书 2 页 说明书 9 页

## [54] 发明名称

食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒及其制备方法

## [57] 摘要

本发明公开了食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒及其制备方法，应用纯化的食物过敏原蛋白包被酶标板。试剂盒组成包括已包被食物过敏原蛋白的酶标板、人 IgG4 标准液、酶标记抗体、TMB 底物显色液、样品稀释液、浓缩洗涤液和终止反应液。样品血清中的特异性 IgG4 抗体结合固定在酶标板微孔表面上的相应抗原，酶标记抗体识别 IgG4 并与之结合，形成抗原—IgG4—抗体—酶的复合物，酶与底物反应显色后测出吸光度，由标准曲线计算出样本血清中的特异性 IgG4 抗体浓度。使用样品血清中过敏原特异性 IgG4 抗体浓度作为食物过敏原暴露状况的生物指标，判断患者的免疫偏差和免疫耐受性，也可用于患者选择特定食物进行免疫治疗疗效的监控。

1、食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒，其特征在于该试剂盒组成包括已包被的奶类、蛋类、肉类、谷物类、坚果类、水果类、蔬菜类、水产类、豆类食物过敏原蛋白酶标板、人 IgG4 标准液、酶标记抗体、TMB 底物显色液、样品稀释液、浓缩洗涤液和终止反应液；

其中：

已包被的奶类食物过敏原蛋白的酶标板包括：牛奶、羊奶；

已包被的蛋类食物过敏原蛋白的酶标板包括：家禽蛋白、家禽蛋黄；

已包被的肉类食物过敏原蛋白的酶标板包括：猪肉、牛肉、羊肉、鸭肉、鸡肉、鹅肉；

已包被的谷物类食物过敏原蛋白的酶标板包括：玉米、小麦、燕麦、大麦、荞麦、大米、小米；

已包被的坚果类食物过敏原蛋白的酶标板包括：杏仁、花生、榛子、腰果、核桃、开心果、巴西坚果、芝麻；

已包被的水果类食物过敏原蛋白的酶标板包括：西瓜、菠萝、橙子、芒果、香蕉、柑桔、胡柚、柠檬、苹果、葡萄、梨、草莓、桃；

已包被的蔬菜类食物过敏原蛋白的酶标板包括：芹菜、菠菜、洋葱、茄子、大蒜、辣椒、土豆、西红柿；

已包被的水产类食物过敏原蛋白的酶标板包括：带鱼、黄鱼、比目鱼、三文鱼；鲤鱼、鲫鱼、草鱼、鲢鱼、虾、蟹、蚌、贻贝、牡蛎、黄鳝、鳊鱼；

已包被的豆类食物过敏原蛋白的酶标板包括：扁豆、蚕豆、黄豆、豌豆；

酶标记抗体：辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG4 单克隆抗体；

TMB 底物显色液：2.08mmol/L 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺，12mmol/L 过氧化氢，10mmol/L  $\beta$ -环糊精，0.1mol/L pH5.0 的醋酸缓冲液。

样品稀释液：10mmol/L pH7.4-7.6 的磷酸盐缓冲液中含 1% BSA，0.05% Tween-20 和 1mg/L 庆大霉素；

浓缩洗涤液：0.1mol/L pH7.4-7.6 的磷酸盐缓冲液中含 1%胎牛血清，0.5% Tween-20 和 20mg/L 庆大霉素；

终止反应液：1.0mol/L  $H_2SO_4$ 。

2、根据权利要求 1 所述的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒，其特征在于所说的酶标板为 96 孔。

3. 权利要求 1 所述的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒的

制备方法，其特征在于包括如下步骤：

- (1) 食物过敏原蛋白的制备：将含过敏原蛋白的食物材料经粉碎、脱脂、提取、SDS-PAGE 电泳确证、洗脱、干燥；
- (2) 酶标记抗体的制备：用辣根过氧化物酶标记纯化的抗人 IgG4 抗体；
- (3) 配制人 IgG4 标准液、TMB 底物显色液、浓缩洗涤液和终止反应液；
- (4) 酶标板包被：用抗人 IgG4 抗体和食物过敏原蛋白包被酶标板，并封闭。

## 食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒及其制备方法 技术领域

本发明涉及了一种半定量检测人血清中食物过敏原特异性 IgG4 抗体的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

几十年来, 医学界一直在密切关注和研究食物过敏反应和诱发过敏性疾病的天然食物、转基因改良食物、食物添加剂及防腐剂。食物过敏反应分 IgE 免疫介导的过敏反应和非 IgE 免疫介导的过敏反应。在 IgE 介导的过敏反应中, 食物中的过敏原成分刺激产生的食物过敏原特异性 IgE 抗体与在肥大细胞, 嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和血小板等细胞膜表面的  $Fc\epsilon R1$  和  $Fc\epsilon R2$  受体结合, 释放组胺、肿瘤坏死因子 (TNF $\alpha$ ) 等炎症介质, 引起过敏反应的病症。在非 IgE 免疫介导的食物过敏反应中, 食物过敏原诱导人肥大细胞和嗜碱性粒细胞膜上的 IgG 抗体高亲和受体  $Fc\gamma R1$  活化, 与 IgG 结合后集聚、脱颗粒、释放组胺和花生四烯酸代谢物等炎症介质, 触发恶心、腹泻、腹痛等胃肠道症状和其他典型的过敏性鼻炎, 过敏性皮炎及风疹等过敏性疾病 (Tkaczy c et al,2002,Mol Immunol,38:1289-1296)。IgG 抗体是多态形的, 有 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 等 4 种亚类。Halpern SR et al 建议 IgG 致敏抗体实际上是 IgG4(Halpern SR et al,2001,Hematology (Oxford),40:1175-1179)。Okayama Y et al 证实, 人肥大细胞上的  $Fc\gamma R1$  受体活化释放的炎性介质与 IgE 抗体高亲和受体  $Fc\epsilon R1$  受体激发释放的炎性介质定性上是无法区分的 (Okayama Y et al,2001,J Immunol,166;4705-4712)。Ruiter B et al 的研究发现, 与非过敏体质的个体相比, 无牛奶过敏史的过敏体质儿童和成人的牛奶致敏蛋白特异性 IgG4 水平较高; 对牛奶耐受的过敏体质和非过敏体质个体都发现有卵类粘蛋白特异性 IgG4 抗体, 但没有发现有尘螨的特异性 IgG4 抗体。由此得出对牛奶耐受的过敏体质儿童和无牛奶过敏反应成人与提高特异性 IgG4 水平, 同时降低特异性 IgE 抗体水平相一致。牛奶耐受过敏体质个体特异性 IgG4 水平上调可能与过敏原的类型及其暴露的剂量相关 (Ruiter B et al,2007,Clin EXP Allergy,37:1103-1110)。Greenberger PA 认为: 过敏性疾病的免疫治疗减轻过敏性疾病的症状, 特别是对过敏性鼻炎和过敏性哮喘的免疫治疗, 反映了细胞因子和免疫球蛋白受过敏原刺激而改变, 抗抗原的 IgG 抗体水平升高 2-10 倍, IgG4 升高 10-100 倍, 而抗抗原的 IgE 抗体水平则明显下降, 鼻腔或支气

管的肥大细胞和嗜碱性粒细胞的数目减少, 下调淋巴细胞和 IL-4, 而干扰素  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) 的增高不足 (Greenberger PA, 2002, Immunotherapy update: Mechanism of action, Allergy Asthma Proc, 23: 373-376)。这些研究清楚的说明了 IgG4 在免疫治疗中的封闭抗体作用是抑制过敏原诱导从碱性粒细胞和肥大细胞释放炎性介质, 同时将过敏原展示于 T 细胞、抑制 T 细胞活性。IgG4 作为致敏抗体或封闭抗体的双重作用是 IgG4 抗体有二种亚型: IgG4a 和 IgG4b; IgG4a 与 IgG1、IgG3 的结构上有一定程度相似, 而 IgG4b 与 IgG2 结构上相似 (Van Der Zee JS, Aalberse RC, 1988, N Engl Reg Allergy Proc, 9:31-33)。

IgG (主要是 IgG4) 介导的免疫食物过敏反应发病迟缓, 通常在摄入食物 24-120 小时之后, 临床表现为多个系统的慢性症状, 患者很难做出自我诊断, 且检测手段不普及, 造成临床诊断的困难。免疫治疗过敏性疾病的过程中, 患者血清中特异性 IgE 浓度逐渐下降至某一范围, 而特异性 IgG4 却逐渐上升至某一水平, 成为免疫治疗的疗效的评估指标, 酶免疫分析体外检测过敏患者血清中食物过敏原特异性 IgG4 抗体浓度的优越性就突出了。

酶免疫分析中有多种检测结合酶的方法, 如荧光法、化学发光法和 TMB 比色法等。其中 TMB 比色法的酶联免疫吸附分析(ELISA)方法只需使用普通普及型的酶标议, 经济快速、简单安全、适合我国多级医院使用。

ELISA 方法检测血液样本中食物过敏原特异性 IgG4 抗体 (sIgG4) 是利用固相载体固定的过敏原蛋白识别样品液中的 sIgG4 并与 sIgG4 结合, 洗去未结合的其他蛋白, 再加入酶标记的抗人 IgG4 抗体与已经结合在固定抗原上的 sIgG4 抗体结合, 形成过敏原—sIgG4—抗体—酶的复合物, 通过与酶底物显色液反应, 检测结合的酶量, 间接地测定出样品液中的 sIgG4 浓度及特定的过敏原。ELISA 方法应用的多种技术, 如过敏原蛋白的提取纯化方法, 人 IgG4 抗体和抗人 IgG4 抗体的制备、纯化, 酶标记抗体的制取纯化等均已成熟 (T, kiessig ST, 1992, Enzyme immunoassay techniques, An overview, J Immunol Methods, 150: 5-21), 且可按美国临床实验室标准化委员会的文件 (I/LA20-A) 评价质量, 为食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒的商品化生产奠定了技术基础。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种灵敏度高、特异性强、使用方便、快速地半定量检测人血清中的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒及其制备方法。使用试剂盒检测样品血清中食物过敏原特异性 IgG4 抗体浓度, 用以判

断患者的免疫偏差和免疫耐受性以及免疫治疗过程中疗效的判定指标。

本发明的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒,其组成包括已包被的奶类、蛋类、肉类、谷物类、坚果类、水果类、蔬菜类、水产类、豆类食物过敏原蛋白的酶标板、人 IgG4 标准液、酶标记抗体、TMB 底物显色液、样品稀释液、浓缩洗涤液和终止反应液;

其中:

已包被的奶类食物过敏原蛋白的酶标板包括:牛奶、羊奶;

已包被的蛋类食物过敏原蛋白的酶标板包括:家禽蛋白、家禽蛋黄;

已包被的肉类食物过敏原蛋白的酶标板包括:猪肉、牛肉、羊肉、鸭肉、鸡肉、鹅肉;

已包被的谷物类食物过敏原蛋白的酶标板包括:玉米、小麦、燕麦、大麦、荞麦、大米、小米;

已包被的坚果类食物过敏原蛋白的酶标板包括:杏仁、花生、榛子、腰果、核桃、开心果、巴西坚果、芝麻;

已包被的水果类食物过敏原蛋白的酶标板包括:西瓜、菠萝、橙子、芒果、香蕉、柑桔、胡柚、柠檬、苹果、葡萄、梨、草莓、桃;

已包被的蔬菜类食物过敏原蛋白的酶标板包括:芹菜、菠菜、洋葱、茄子、大蒜、辣椒、土豆、西红柿;

已包被的水产类食物过敏原蛋白的酶标板包括:带鱼、黄鱼、比目鱼、三文鱼;鲤鱼、鲫鱼、草鱼、鲢鱼、虾、蟹、蚌、贻贝、牡蛎、黄鳝、鳗鱼;

已包被的豆类食物过敏原蛋白的酶标板包括:扁豆、蚕豆、黄豆、豌豆;

酶标记抗体:辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG4 单克隆抗体;

TMB 底物显色液: 2.08mmol/L 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺, 12mmol/L 过氧化氢, 10mmol/L  $\beta$ -环糊精, 0.1mol/L pH5.0 的醋酸缓冲液。

样品稀释液: 10mmol/L pH7.4-7.6 的磷酸盐缓冲液中含 1% BSA, 0.05% Tween-20 和 1mg/L 庆大霉素;

浓缩洗涤液: 0.1mol/L pH7.4-7.6 的磷酸盐缓冲液中含 1%胎牛血清, 0.5% Tween-20 和 20mg/L 庆大霉素;

终止反应液: 1.0mol/L  $H_2SO_4$ 。

本发明的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

(1) 食物过敏原蛋白的制备: 将含过敏原蛋白的食物材料经粉碎、脱脂、

提取、SDS-PAGE 电泳确证、洗脱、干燥；

(2) 酶标记抗体的制备：用辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记纯化的抗人 IgG4 抗体；

(3) 配制人 IgG4 标准液、TMB 底物显色液、浓缩洗涤液和终止反应液；

(4) 酶标板包被：用抗人 IgG4 抗体和食物过敏原蛋白包被酶标板，并封闭。

本发明的试剂盒的使用方法，包括如下操作步骤：

(1) 加入样品液和标准液到相应的酶标板微孔中，使样品液中的食物过敏原特异性 IgG4 抗体各自与相应的固相过敏原蛋白结合或标准液中的 IgG4 与固相载体上的抗人 IgG4 抗体结合，洗去未结合的杂蛋白和其他物质；

(2) 使已结合的人 IgG4 抗体与 HRP-抗人 IgG4 抗体相结合，洗去多余的酶标记抗体；

(3) 加入 TMB 底物显色液，室温孵育反应，终止酶反应后检测显色反应的强度。

本发明的有益效果在于：

本发明建立了夹心式 ELISA 方法间接测定样品液中的食物过敏原特异性 Ig G4 抗体含量，检测灵敏度小于 0.3ng/ml，剂量—反应曲线的线性相关系数  $\geq 0.99$ ，具有简便、快速、灵敏、稳定的优点。体内过敏原特异 IgG4 抗体的封闭抗体特性能控制 IgE 抗体识别过敏原，调控过敏反应和 IgE 介导的免疫反应，故检测患者血清中过敏原特异性 IgG4 抗体水平，为体外诊断提供患者食物过敏原暴露状况的生物指标，尤其可为患者免疫治疗疗效判断提供特有的指标。

## 具体实施方式

以下结合实施例进一步说明本发明。

### 实施例 1

本发明的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒，其组成包括已包被的奶类、蛋类、肉类、谷物类、坚果类、水果类、蔬菜类、水产类、豆类食物过敏原蛋白的酶标板、人 IgG4 标准液、酶标记抗体、TMB 底物显色液、样品稀释液、浓缩洗涤液和终止反应液。

上述的酶标板为 96 孔（12 条 8 孔或 8 条 12 孔）。

本发明的食物过敏原特异性 IgG4 抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法：

#### 1. 食物过敏原蛋白的制备

## 1.1 食物过敏原蛋白的粗浸提液

### 1.1.1 奶类提取液

奶类浸液的制作有两种方法：

(1) 先用离心法(2400 转/分钟)离心 15 分钟,用小匙除去上层脂肪,取 400ml 脱脂乳,加入 5ml 1%凝乳酶或乳冻片,不搅拌,放入 37℃恒温水浴或孵箱内 30 分钟,如乳清蛋白与酪蛋白(casein)分离,用干净纱布过滤,再用普通滤纸过滤。按 1:2(W/V)的比例,用缓冲盐水提取液稀释乳清蛋白即为乳清蛋白提取液。

(2) 将含有乳清的滤液加 3 倍丙酮,放入冰箱 24h,使乳清沉淀;用离心法除去上清液,再用丙酮浸洗几次,干燥后研细成粉末贮存。提取时按 1:50(W/V)用缓冲盐水提取液在冰箱内提取 48 小时,每日搅拌或振荡 2 小时。酪蛋白用丙酮和乙醚反复脱脂、最后研磨,用 3 号或 4 号筛筛出,按 1:50(W/V)比例提取。

### 1.1.2 蛋类提取液

蛋白和蛋黄均按 1:20(W/V)的比例用缓冲盐水提取液稀释,充分混匀后直接过滤和除菌,不需提取,亦无需作毒性试验。

蛋黄也可制成干粉,方法是加入丙酮脱脂 2-3 小时,倾去丙酮层,待挥发干燥后,用打碎机打碎,再用乙醚脱脂 4 小时备用。蛋黄干粉按 1:50 比例(W/V)用缓冲盐水提取液提取。

### 1.1.3 肉类提取液

取新鲜瘦肉,去掉脂肪和结缔组织,剁成碎末,或用绞肉机绞碎。交替用甲苯、二甲苯、丙酮及乙醚等不同溶剂反复脱脂,室温下干燥,过筛,贮存于密闭玻璃瓶中备用。

按 1:25(W/V)的比例用缓冲盐水提取液提取 48 小时,提取过程中每日搅拌或振荡 2 小时。

粗滤后如液体混浊,可用分液漏斗加乙醚再脱脂。

### 1.1.4 谷物、坚果、豆类蛋白提取液

(1) 干燥、去壳、脱皮、磨粉贮存;在索氏提取器中按粉:正己烷=1:10(W/V)的比例脱脂 6 小时,干燥脱脂粉再磨细贮于-20℃下的密封容器中备用。

(2) 脱脂粉用提取缓冲液(含 20mmol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,1mol/L  $\text{NaCl}$ ,pH7.0)提取蛋白;脱脂粉:提取缓冲液的比例为 1g:10ml(W/V),室温提取 1.5 小时,然后

4℃下 20000g 离心 30 分钟，保存上清液。

### 1.1.5 水果、蔬菜类蛋白提取液

将 100g 水果（包括果皮、去核）、蔬菜洗净、凉干、切碎后加入 150ml 20mmol/l PBS (pH7.4) 溶液，其中含 2%的聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) 悬浮颗粒，2mmol/l 的 EDTA，10mmol/l 的二乙二硫基氨基甲酸酯 (DIECA) 钠和 3mmol/l 的  $\text{NaN}_3$ ，匀浆 4℃提取 4 小时后，12000g4℃下离心 30 分钟，上清液 -20℃下保存。

### 1.1.6 水产类蛋白提取液

取新鲜水产肉，去脂肪，粉碎。用丙酮或乙醚反复脱脂、室温下干燥，过筛，贮存于密闭玻璃瓶中备用。

按 1: 25 (W/V) 的比例用缓冲盐水提取液提取 48 小时，提取过程中每日搅拌或振荡 2 小时。

粗滤后如液体混浊，可用分液漏斗加乙醚再脱脂。

## 1.2 食物过敏原蛋白的提取

食物过敏原蛋白的粗提取液先经微生物培养检测，农药残留测定，取合格品再经透析、SDS-PAGE 电泳免疫印迹确认、割胶、离心提取的较纯的过敏原蛋白组分。

(1) 将浸提液在透析袋 (MWCO 10000) 中对 10mmol/L PBS(pH7.2)透析 48 小时，期间缓缓搅动 PBS 溶液，并更换 PBS 液 4 次；

(2) 透析后的过敏原蛋白溶液过 0.45 $\mu\text{m}$  滤膜，并稀释成 4mg/ml 的蛋白溶液；

(3) 过敏原蛋白溶液灌入 SDS-PAGE 的胶柱，电泳分离；在分子量 10-100kD 的区域用病人阳性血清在一个电泳胶柱进行免疫印迹，显色；

(4) 切割下其余胶柱过敏原蛋白定位的相应条带，加入适量 PBS 溶液后，室温 2000g 离心 10 分钟；

(5) 测出过敏原蛋白溶液的浓度，加入适量防腐剂，-20℃下冷冻贮存。

## 2. 人 IgG4 标准液的制备

### 2.1 材料

人 IgG4 抗体：来源于人血浆中经亲和色谱纯化，纯度>95%的人 IgG4 抗体（购自美国 Meridian life science 公司）。

### 2.2 步骤

用样品稀释液将人 IgG4 抗体配制成浓度为 300、100、30、15、3.0、0.30ng/ml

人 IgG4 标准液。

### 3. 包被酶标板

#### 3.1 材料

(1) 活化处理过的酶标板(Nunc, Nunc-Immuno plates<sup>TM</sup>, USA 或 Greiner, Greiner labortechnik, Germany);

(2) 食物过敏原蛋白;

(3) 0.05mol/L 碳酸缓冲液 (pH9.6) 或活化包被液;

(4) 0.01mol/L PBS 溶液;

(5) 3% BSA 封闭液;

(6) 金属箔袋及真空封口机等。

#### 3.2 步骤

(1) 用包被液 (0.05mol/L 碳酸缓冲液, pH9.6 或根据食物过敏原蛋白的特性选择的活化包被液) 适当稀释过敏原蛋白溶液成 0.05 $\mu$ g/ml-10 $\mu$ g/ml 的包被浓度, 混匀, 待包被的活化处理过的酶标板微孔内每孔加入 100 $\mu$ l;

(2) 酶标板封膜后 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜;

(3) 倒掉包被的抗体和抗原溶液, 洗板, 每孔加入 250 $\mu$ l 3%BSA 封闭液, 4 $^{\circ}$ C 下封闭过夜;

(4) 倒空封闭液, 用洗涤液洗板 4 次, 拍干;

(5) 将酶标板真空干燥后, 密封入带干燥剂的金属箔袋内, 在 4 $^{\circ}$ C 下贮存。

## 4. 酶标记抗体 (辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗人 IgG4 抗体) 的制备

### 4.1 材料

(1) 辣根过氧化物酶 (HRP, RZ>3.2, 活性>200U/ml; 购自美国 Sigmaaldrich 公司);

(2) 0.1mol/L NaIO<sub>4</sub> 溶液;

(3) 0.2mol/L 碳酸缓冲液, pH9.5;

(4) 抗人 IgG4 抗体 (购自美国 Sigmaaldrich 公司);

(5) 4.0mg/ml 的 NaBH<sub>4</sub> 溶液;

(6) 0.15mol/L 的 PBS, pH7.4;

(7) Protein A-Sepharose 4 Fast Flow 亲和色谱柱材料及色谱柱;

(8) 亲和色谱纯化用的柠檬酸、磷酸及 Tris 缓冲液;

(9) Sephadex G25 凝胶色谱柱;

(10) 分光光度计等。

## 4.2 步骤

(1)称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中,然后加入 0.2ml 新配的 0.1mol/L  $\text{NaIO}_4$  溶液,室温下避光搅拌 20 分钟;

(2)将上述溶液装入透析袋中,对 1mol/L pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;

(3)加 20 $\mu$ l 0.2 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液,使以上已醛化的 HRP 溶液的 pH 升高到 9.0~9.5,然后立即加入 10mg 抗人 IgG4 抗体在 1ml 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌 2 小时;

(4)加 0.1ml 新配的 4mg/ml  $\text{NaBH}_4$  液,混匀,4℃下再静置 2 小时;

(5)将上述溶液装入透析袋中,对 0.15 mol/L pH7.4 PBS 透析,4℃过夜。少量沉淀应离心弃去;

(6)色谱柱中装入 2ml Protein A-Sepharose 4 Fast Flow;用 5ml pH3.0 柠檬酸钠缓冲液清洗柱,接着用 10ml pH8.0 的磷酸缓冲液清洗;

(7)用 Tris 调节上述制备的 HRP 标记的抗人 Ig G4 抗体溶液的 pH 值至 8.0,以约 5ml/小时的速度将标记制备的 HRP-抗人 IgG4 抗体溶液上柱;

(8)用 pH8.0 的磷酸缓冲液清洗色谱柱,清洗流出液含非免疫球蛋白等杂蛋白;

(9)用 10ml 0.1mol/L 的柠檬酸钠缓冲液洗脱 HRP-抗人 IgG4 抗体。酶标记抗体洗脱后柱用 10ml 磷酸缓冲液清洗;

(10)在 280nm 处监控洗脱液的吸光度,收集大于基线的馏份。收集的馏份迅速用 2mol/L Tris 溶液中和;

(11)收集的馏份过 PD10 (Sephadex G25) 柱并用 PBS 交换洗脱馏份的介质溶液;

(12)灭菌后,加入载体蛋白冷冻干燥,收集的酶标记抗体,贮存在 4℃以下的暗处。

## 5.过敏原特异性 Ig G4 抗体 ELISA 检测试剂盒的使用方法

### (1) 酶标板条安装

已包被的酶标板条平衡至室温后,开启包装袋,取出所需检测食物过敏原蛋白包被的酶标板条组合,牢固地安装在酶标板框架上。不需用的酶标板置于包装袋中,驱气密封好,放在 2-8℃下贮存。

### (2) 样品孵育

取 100 $\mu$ l 人 IgG4 标准液系列和稀释后的样品液加入到相应的包被酶标板

孔中；空白孔中只加入 100 $\mu$ l 样品稀释液；用膜封好酶标板孔，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 45 分钟。

### (3) 洗板

吸走或倒空孔中液体，洗板 4 次后拍干。

### (4) 酶标记抗体孵育

用移液器每孔加入 100 $\mu$ l 酶标记抗体溶液；封好酶标板，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育反应 45 分钟；如步骤 (3) 洗板 4 次。

### (5) 底物反应显色

每孔加入 100 $\mu$ l TMB 底物显色液，轻轻晃摇 30 秒钟，室温静置反应 15 分钟。

### (6) 终止反应检测

每孔加入 100 $\mu$ l 终止反应液，20 分钟内在酶标仪的 450nm 波长下测出每孔的吸光度值。

### (7) 结果计算

计算重复孔的平均吸光度值；以标准溶液系列的平均吸光度值的对数值对相应浓度的对数值进行线性回归，构建剂量—反应曲线；由样品重复孔的平均吸光度值从剂量—反应曲线计算出患者该过敏原的特异性 IgG4 抗体含量。

**实施例 2：**试剂盒用于过敏患者脱敏治疗过程中特异性 IgG4 含量的检测。

一名婴儿时就对牛奶过敏的 8 岁男孩，先双盲试验 15 天无过敏反应症状，牛奶点刺液皮试阳性 IV 级，检测血液中牛奶特异性 IgE (sIgE) 抗体和特异性 IgG4 (sIgG4) 抗体浓度的背景值。第 16 天开始进行逐渐加量的口服牛奶脱敏制剂治疗，疗程 18 个月，并于脱敏治疗后的第 1、3、6、18 个月检测血液中牛奶特异性 IgE 和 IgG4 抗体浓度，结果列于下表：

脱敏治疗 时间 (月)	0	1	3	6	12	18
sIgE 浓度 (IU/ml)	62.3 $\pm$ 7.1	46.8 $\pm$ 5.4	22.2 $\pm$ 8.3	20.5 $\pm$ 4.6	16.4 $\pm$ 6.2	13.7 $\pm$ 5.9
sIgG4 浓度 ( $\mu$ g/l)	120.6 $\pm$ 10.3	122.5 $\pm$ 11.8	143.8 $\pm$ 9.2	145.1 $\pm$ 10.8	146.3 $\pm$ 12.6	135.9 $\pm$ 13.4

上表数据说明：使用本发明的试剂盒可简便、快速、准确地检测出样本中 sIgG4 含量作为免疫治疗过程中疗效的生物指标。

专利名称(译)	食物过敏原特异性IgG4抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101256186A</a>	公开(公告)日	2008-09-03
申请号	CN200810060570.4	申请日	2008-03-28
[标]发明人	吴善东		
发明人	吴善东		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了食物过敏原特异性IgG4抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法，应用纯化的食物过敏原蛋白包被酶标板。试剂盒组成包括已包被食物过敏原蛋白的酶标板、人IgG4标准液、酶标记抗体、TMB底物显色液、样品稀释液、浓缩洗涤液和终止反应液。样品血清中的特异性IgG4抗体结合固定在酶标板微孔表面上的相应抗原，酶标记抗体识别IgG4并与其结合，形成抗原-IgG4-抗体-酶的复合物，酶与底物反应显色后测出吸光度，由标准曲线计算出样本血清中的特异性IgG4抗体浓度。使用样品血清中过敏原特异性IgG4抗体浓度作为食物过敏原暴露状况的生物指标，判断患者的免疫偏差和免疫耐受性，也可用于患者选择特定食物进行免疫治疗疗效的监控。

奶特异性 IgE 和 IgG4 抗体浓度，结果列于下表：

脱敏治疗 时间 (月)	0	1	3	6	12	18
sIgE 浓度 (IU/ml)	62.3±7.1	46.8±5.4	22.2±8.3	20.5±4.6	16.4±6.2	13.7±5.9
sIgG4 浓度 (µg/l)	120.6±10.3	122.5±11.8	143.8±9.2	145.1±10.8	146.3±12.6	135.9±13.4