



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102331495 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 25

(21) 申请号 201110167106. 7

(22) 申请日 2011. 06. 21

(71) 申请人 沃克(天津)生物科技有限公司

地址 300384 天津市南开区华苑产业园区榕苑路 16 号鑫茂科技园 A 座 IJ 单元 6 层右侧

(72) 发明人 李会强 李立和 陈寅 靳宝英
张珩 张明华

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司 12103

代理人 董光仁

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

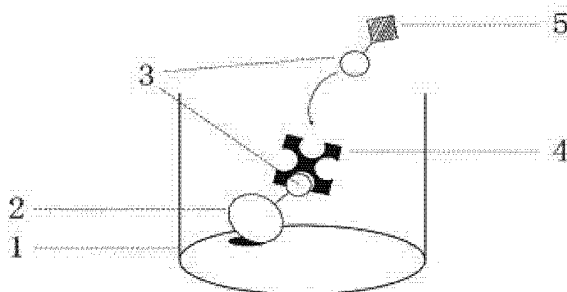
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

食物过敏原检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种食物过敏原检测试剂盒及其制备方法,属于酶联免疫检测技术。本发明包括显色液 A、显色液 B,终止液,酶标抗 IgE 抗体,而在聚苯乙烯微孔板上包被有生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素;以及常见的多种过敏原如牛奶过敏原,鸡蛋过敏原,虾蟹过敏原等分别标记生物素。检测时,选择所需种类的生物素化过敏原与患者血清一道加入微孔板,生物素化过敏原与血清中的特异性抗体结合的同时,生物素和链霉亲和素结合,从而使过敏原-特异性抗体复合物固定于微孔板上,实现包被和反应的同步进行。通过一个检测试剂盒提供多种项目组合,满足患者个性化的检测需求。提高了检测试剂的通用性和利用率,避免无关项目的检测和试剂浪费。



1. 一种食物过敏原检测试剂盒的制备方法,包括显色液 A、显色液 B,终止液,酶标抗 IgE 抗体,其特征在于:该试剂盒还包括包被了生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素的聚苯乙烯微孔板,多种分别生物素化过敏原,其中:

a. 包被了生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素的聚苯乙烯微孔板,是在聚苯乙烯微孔板上,每孔加入稀释液 I 稀释的浓度为 3-5 $\mu\text{g/ml}$ 的生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液 150 μl ,甩净后用稀释液 I 洗板,甩净,拍干;每孔再加入稀释液 II 稀释的浓度为 3-5 $\mu\text{g/ml}$ 的链霉亲和素包被缓冲液 150 μl ,温浴,甩净,用稀释液 II 洗板,甩净,拍干;每孔加入封闭溶液体积 250 μl ,温浴过夜,甩净,拍干备用;

b. 多种生物素化过敏原,即将多种纯化的特异性抗体的过敏原分别用 0.1mol/L, pH9.5 的 NaHCO_3 缓冲液透析,过夜并于 280nm 处测吸光度值,计算抗体总量;另将多种活化的生物素分别溶于二甲基甲酰胺,按照生物素与过敏原的摩尔比为 15-20:1 的比例将二者混合反应 1h,反应后的液体分别再用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 24 小时,分装于试剂瓶中备用。

2. 根据权利要求 1 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其特征在于:多种纯化的特异性抗体的过敏原分别是牛奶过敏原,鸡蛋过敏原,虾蟹过敏原,小麦过敏原,花生过敏原。

3. 根据权利要求 1 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其特征在于:稀释液 I 是按以下重量百分比的原料制备的:

三羟甲基氨基甲烷	0.606g/100ml
氯化钠	0.877g/100ml
Proclin 300	0.05ml/100m

双蒸水 950 ml 调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

4. 根据权利要求 1 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其特征在于:稀释液 II 是按以下重量百分比的原料制备的:

磷酸二氢钠	0.468g/100ml
磷酸氢二钠	0.716g/100ml
L-色氨酸	0.02g/100ml
氯化钠	0.877g/100ml

双蒸水 950 ml 调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

5. 根据权利要求 1 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其特征在于:封闭溶液是按以下重量百分比的原料制备的:

磷酸二氢钠	0.029g/100ml
磷酸氢二钠	0.29g/100ml
6-氨基己酸	0.3g/100ml
氯化钠	0.876g/100ml
双蒸水	450 ml 调 pH=7.3~7.5
牛血清白蛋白	0.4g/100ml
蔗糖	3.5g/100ml
Procilin 300	0.05ml/100ml

加双蒸水定溶至 500 ml 。

6. 根据权利要求 1 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其特征在于:一种食物过敏原检测试剂盒,包括显色液 A、显色液 B,终止液,IgE 抗体,其特征在于:该试剂盒还包括包被了生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素的聚苯乙烯微孔板,多种的生物素化过敏原。

食物过敏原检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种食物过敏原检测试剂盒及其制备方法,属于酶联免疫检测技术。

背景技术

[0002] 机体对某种食物过敏时,会在体内产生特异性抗体,能特异性结合食物中导致过敏的成份——过敏原。

[0003] 目前,临床上常采用检测特异性抗体的种类来确定患者食物过敏的类型,而酶联免疫吸附实验是常用的检测方法。

[0004] 传统的食物过敏酶联免疫检测法通常采用的都是直接包被模式,即由生产厂家预先将过敏原固相化于作为载体的聚苯乙烯微孔板上,供检测人员直接使用。然而,食物过敏的种类很多,同一患者可对多种食物过敏,但存在个体差异。在检测时往往需要同时进行多种过敏原的检测,而每一个患者所需的检测组合又各不相同。传统试剂常常由生产厂家将多种过敏原同时包被于微孔板制成类似套餐性质的检测组合,由于采用直接包被法,组合方式将无法改变。而实际工作中,每一患者的检测需要各不相同,食物过敏组合是个性化的,往往与厂家提供的项目组合产生冲突,造成多余的检测和漏检,同时会增加检测成本。

[0005] 链霉亲和素与生物素系统,是基于生物素与链霉亲和素相结合这一特性所建立的体系称为生物素-亲和素系统。

[0006] 生物素(biotin,B)分子量为 244.31,现已能人工合成,制备方便。生物素基本结构为双环结构:I 环为咪唑酮环,是与亲和素结合的部位;II 为噻吩环,含一个戊酸侧链,其末端羧基可与生物大分子连接,形成生物素标记抗原、抗体、酶等。生物素与生物大分子结合后并不影响生物分子和生物素原有的生物活性,即生物素标记抗体同时具备与亲和素和相应抗原结合之特性。链霉亲和素(streptavidin, SA),分子量 65KD,由四条相同的肽链组成,一个链霉亲和素分子能结合四个生物素分子。与亲和素相比,链霉亲和素对生物素具有高度亲和力(亲和常数为 $10^{15}/\text{mol}$),与生物素结合后形成非常稳定复合物,很难解离。

发明内容

[0007] 本发明就是为了克服直接包被模式制备的食物过敏酶标反应板,无法满足患者个性化需求的不足,而提供一种灵活选择所需过敏原,包被和检测过程同步进行的食物过敏原检测试剂盒及其制备方法。

[0008] 本发明的设计原理是引入生物素-亲和素间接包被模式,对酶标反应板的包被制作环节进行改进,过敏原不需预先包被,而是标记上生物素,同包被了亲和素的微孔反应板同时提供给使用者,检测人员根据被检者的具体情况灵活选择所需过敏原并可同血清一道加入微孔板,实现即时包被,并且包被和检测过程同步进行。

[0009] 本发明是按以下技术方案设计的。

[0010] 一种食物过敏原检测试剂盒的制备方法,包括显色液 A、显色液 B,终止液,酶标抗 IgE 抗体,该试剂盒还包括包被了生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素的聚苯乙烯微孔板,

多种分别生物素化过敏原,其中:

a. 包被了生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素的聚苯乙烯微孔板,是在聚苯乙烯微孔板上,每孔加入稀释液 I 稀释的浓度为 $3-5 \mu\text{g/ml}$ 的生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液 $150 \mu\text{l}$,甩净后用稀释液 I 洗板,甩净,拍干;每孔再加入稀释液 II 稀释的浓度为 $3-5 \mu\text{g/ml}$ 的链霉亲和素包被缓冲液 $150 \mu\text{l}$,温浴,甩净,用稀释液 II 洗板,甩净,拍干;每孔加入封闭溶液体积 $250 \mu\text{l}$,温浴过夜,甩净,拍干备用;

b. 多种生物素化过敏原,即将多种纯化的特异性抗体的过敏原分别用 0.1mol/L , $\text{pH}9.5$ 的 NaHCO_3 缓冲液透析,过夜并于 280nm 处测吸光度值,计算抗体总量;另将多种活化的生物素分别溶于二甲基甲酰胺,按照生物素与过敏原的摩尔比为 $15-20:1$ 的比例将二者混合反应 1h ,反应后的液体分别再用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 4°C 透析 24 小时,分装于试剂瓶中备用。

[0011] 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其多种纯化的特异性抗体的过敏原分别是牛奶过敏原,鸡蛋过敏原,虾蟹过敏原,小麦过敏原,花生过敏原等。

[0012] 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其稀释液 I 是按以下重量百分比的原料制备的:

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	6.06 g (0.606g/100ml)
氯化钠(NaCl)	8.77 g (0.877g/100ml)
Proclin 300	0.5ml (0.05ml/100ml)

双蒸水(ddH_2O) 950 ml 调 $\text{pH}=8.0$ 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml 。

[0013] 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其稀释液 II 是按以下重量百分比的原料制备的:

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.68 g (0.468g/100ml)
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	7.16 g (0.716g/100ml)
L-色氨酸(L-Tryptophan)	0.2 g (0.02g/100ml)
氯化钠 (NaCl)	8.77g (0.877g/100ml)
双蒸水 (ddH_2O)	950 ml 调 $\text{pH}=8.0$ 定溶至 1000 ml 。

[0014] 所述食物过敏原检测试剂盒的制备方法,其封闭溶液是按以下重量百分比的原料制备的:

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.145 g (0.029g/100ml)
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.45 g (0.29g/100ml)
6-氨基己酸 (ACA)	1.5 g (0.3g/100ml)
氯化钠 (NaCl)	4.38 g (0.876g/100ml)
双蒸水 (ddH_2O)	450 ml 调 $\text{pH}=7.3 \sim 7.5$
牛血清白蛋白 (BSA)	2.0 g (0.4g/100ml)
蔗糖	17.5 g (3.5g/100ml)
Proclin 300	0.25 ml (0.05ml/100ml)

加双蒸水定溶至 500 ml 。

[0015] 如上所述一种食物过敏原检测试剂盒,包括显色液 A、显色液 B,终止液,酶标抗 IgE 抗体,该试剂盒还包括包被了生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素的聚苯乙烯微孔板,

多种的生物素化过敏原。

[0016] 使用时根据患者的病史等情况选择所需的过敏原分别加入通用反应板,同时加入患者血清,血清中的特异性抗体与过敏原通过抗原抗体反应结合的同时,过敏原通过生物素和微孔板的链霉亲和素结合,从而过敏原-特异性抗体复合物固定于微孔板上,其后的反应过程和结果判读过程同传统的酶联免疫检测模式,即洗板去除未结合成分,再加入酶标记的第二抗体-IgE 抗体(PAb)同固定与微孔板的待检抗体结合,通过酶催化底物显色而得出结果。如果血清中不含该特异性抗体,则反应不能顺利进行,最终不会显色。

[0017] 这样设计的本发明:

1. 克服了传统的直接包被模式不能满足患者个性化检测需求的不足,便于检测人员根据患者临床表现选择疑似的食物种类进行鉴别,方便灵活地选择项目组合,提高了检测试剂的通用性和利用率,避免无关项目的检测和试剂浪费,减少检测成本;由于包被和检测过程的同步进行,反应时间和操作并未增加,而使检测操作更加方便。

[0018] 2. 链霉亲和素与生物素之间具有较高亲和力,确保酶标反应板具有很好稳定性。牛血清白蛋白分子来源丰富,价格低廉,且易于包被于酶标反应板。

附图说明

[0019] 附图是过敏原间接包被模式的原理示意图。

[0020] 其中:1:聚苯乙烯微孔板 4:链霉亲和素
2:生物素化牛血清白蛋白 5:生物素化过敏原
3:生物素。

具体实施方式

[0021] 下面结合附图和实施例对本发明进行详细的说明。

[0022] 一. 相关试剂及配比

1. 稀释液 I:

Tris (三羟甲基氨基甲烷)	6.06 g (0.606g/100ml)
NaCl (氯化钠)	8.77 g (0.877g/100ml)
Proclin 300	0.5ml (0.05ml/100ml)

ddH₂O (双蒸水) 950 ml 调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

[0023] 2. 生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液:

用稀释液 I 将生物素化牛血清白蛋白稀释,终浓度为 5 μg/ml,充分搅拌混匀。

[0024] 3. 稀释液 II:

NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O (磷酸二氢钠)	4.68 g (0.468g/100ml)
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (磷酸氢二钠)	7.16 g (0.716g/100ml)
L-Tryptophan (L-色氨酸)	0.2 g (0.02g/100ml)
NaCl (氯化钠)	8.77g (0.877g/100ml)

ddH₂O (双蒸水) 950 ml 调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

[0025] 4. 链霉亲和素包被缓冲液:

用稀释液 II 将链霉亲和素稀释,终浓度为 3 μg/ml,充分搅拌混匀。

[0026] 5. 封闭溶液：

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (磷酸二氢钠)	0.145 g (0.029g/100ml)
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (磷酸氢二钠)	1.45 g (0.29g/100ml)
ACA (6-氨基己酸)	1.5 g (0.3g/100ml)
NaCl (氯化钠)	4.38 g (0.876g/100ml)
ddH ₂ O (双蒸水)	450 ml 调 pH=7.3~7.5
BSA (牛血清白蛋白)	2.0 g (0.4g/100ml)
蔗糖	17.5 g (3.5g/100ml)
Procilin 300	0.25 ml (0.05ml/100ml)

加 ddH₂O 定溶至 500 ml。

[0027] 6. 磷酸盐缓冲盐水 (0.1mol/L, pH7.4)：

ddH ₂ O (双蒸水)	3600ml
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (磷酸二氢钠)	11.84g (2.96g/1000ml)
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (磷酸氢二钠)	116g (29g/1000ml)

调 pH=7.3~7.45

加 ddH₂O 定容至 4000ml。

[0028] 7. 碳酸氢钠缓冲液 (0.1mol/L, pH9.5)：

ddH ₂ O (双蒸水)	450ml
醋酸钠	8.2g (16.4g/1000ml)
柠檬酸	1.58g (3.16g/1000ml)
30% H ₂ O ₂ (双氧水)	0.27ml (0.54ml/1000ml)

用 1M 柠檬酸或 10M NaOH 调节 pH 值至 5.3, 去离子水定容至 500ml, 分装, 4℃ 储存。

[0029] 8. 显色液 A：市售商品

ddH ₂ O	450ml
醋酸钠	8.2g
柠檬酸	1.58g
30%H ₂ O ₂	0.27ml

pH 值 5.3, ddH₂O 定容至 500ml, 分装, 4℃ 储存。

[0030] 9. 显色液 B：市售商品

ddH ₂ O (双蒸水)	400ml
EDTA (乙二胺四乙酸)	0.186g (0.372g/1000ml)
柠檬酸	0.96g (1.92g/1000ml)
10M NaOH	0.54ml (1.08ml/1000ml)
丙三醇	50ml (100ml/1000ml)
TMB-HCl (四甲基联苯胺二盐酸盐)	0.24g (0.48g/1000ml)

上述反应注意避光, 调节 pH 值 3.0, 用 ddH₂O 定容至 500ml, 分装 4℃ 储存。

[0031] 10. 终止液：

ddH ₂ O	400ml
12M 浓 H ₂ SO ₄	13.9ml (27.8ml/1000ml)

混匀, 用去离子水定容至 500ml, 分装 4℃ 储存。

[0032] 11. 酶标抗 IgE 抗体 (PAb) 系辣根过氧化物酶标记的抗人 IgE 抗体, 为市售商品。

[0033] 二. 制备方法

1. 制备生物素化牛血清白蛋白 - 链霉亲和素酶标反应板。

[0034] 组分:

① 96 孔聚苯乙烯酶标板 (图 1 中“1”); ② 生物素化牛血清白蛋白 (图 1 中“2”); ③ 链霉亲和素 (图 1 中“4”); ④ 牛血清白蛋白。上述组分中生物素化牛血清白蛋白应用浓度为: $5 \mu\text{g/ml}$; 链霉亲和素浓度为: $3 \mu\text{g/ml}$; 牛血清白蛋白浓度为 1% ($\text{g}/100\text{ml}$)。

[0035] 具体步骤:

① 每孔加入生物素化牛血清白蛋白 (图 1 中组分“2”) 包被缓冲液, 体积 $150 \mu\text{l}$ 。将微孔板放在密封的容器内, $18 \sim 25^\circ\text{C}$, 温浴 $16 \sim 18$ 小时。

[0036] ② 甩净包被缓冲液, 用稀释液 I 洗酶标板 2 次, $300 \mu\text{l}/\text{well}$, 每次需静置 10min。

[0037] ③ 甩净稀释液, 并在干净的毛巾上拍干。

[0038] ④ 每孔加入链霉亲和素 (图 1 中组分“4”) 包被缓冲液, 体积 $150 \mu\text{l}$ 。将微孔板放在密封的容器内, $18 \sim 25^\circ\text{C}$, 温浴 2 小时。

[0039] ⑤ 甩净包被缓冲液, 用稀释液 II 洗酶标板 2 次, $300 \mu\text{l}/\text{well}$, 每次需静置 10min。

[0040] ⑥ 重复③。

[0041] ⑦ 每孔加入封闭溶液, 体积 $250 \mu\text{l}$ 。将微孔板放在密封的容器内, 4°C , 温浴过夜。

[0042] ⑧ 甩净封闭溶液, 并在干净的毛巾上拍干。将微孔板真空干燥至少 6 小时。取出后放置于干燥室及时真空包装。

[0043] 2. 制备多种分别生物素化过敏原

① 将纯化好的用于检测特异性抗体的多种过敏原的蛋白浓度调整为约 5mg/ml , 分别用 0.1mol/L , $\text{pH}9.5$ 的碳酸氢钠 (NaHCO_3) 缓冲液透析, 过夜并于 280nm 处测吸光度值, 计算抗体总量。

[0044] ② 分别将活化的生物素溶于二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 按照生物素与抗体的摩尔比为 $20:1$ 的比例将二者混合反应 1h。

[0045] ③ 将反应后的液体用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 于 4°C 透析 24 小时, 即制成生物素化过敏原 (图 1 中组分“5”)

④ 每种候选的生物素化过敏原, 分别装于试剂瓶中, 与生物素化牛血清白蛋白 - 链霉亲和素酶标反应板配套使用。

[0046] 三. 检测项目的组合和包被反应过程

1. 根据检测目的和患者病史等情况, 检测人员可从提供的生物素化过敏原中自由选择出需要检测的一种或多种生物素化过敏原, 如牛奶过敏原、鸡蛋过敏原、虾蟹过敏原、小麦过敏原、花生过敏原等进行项目组合。

[0047] 2. 采用间接法、分两步进行。具体反应程序如下: 微孔板内加入待测过敏血清, 同时每个微孔分别加入生物素标记的过敏原, 37°C 水浴反应, 过敏原通过标记的生物素与上述特制的酶标反应板结合, 相当于传统 ELISA 方法包被过程, 同时, 原通过其抗原表位捕获待测血清中的特异性抗体, 实现包被和反应的同步进行。接下来的步骤同传统 ELISA 方法: 即洗板后加入酶标抗 IgE 抗体 (PAb), 37°C 水浴反应。再次洗涤, 常规加入显色液 A、显色液 B 各 $50 \mu\text{L}$, 避光室温反应 15 min, 加入终止液 $50 \mu\text{L}$, 15 分钟内比色读取吸光度值。

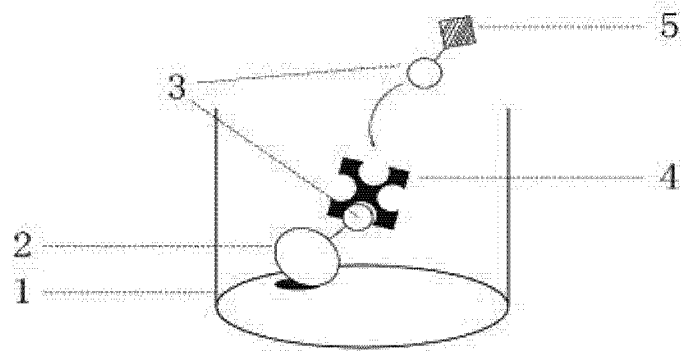


图 1

专利名称(译)	食物过敏原检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102331495A	公开(公告)日	2012-01-25
申请号	CN201110167106.7	申请日	2011-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	李会强 李立和 陈寅 靳宝英 张珩 张明华		
发明人	李会强 李立和 陈寅 靳宝英 张珩 张明华		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
其他公开文献	CN102331495B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种食物过敏原检测试剂盒及其制备方法，属于酶联免疫检测技术。本发明包括显色液A、显色液B，终止液，酶标抗IgE抗体，而在聚苯乙烯微孔板上包被有生物素化牛血清白蛋白-链霉亲和素；以及常见的多种过敏原如牛奶过敏原，鸡蛋过敏原，虾蟹过敏原等分别标记生物素。检测时，选择所需种类的生物素化过敏原与患者血清一道加入微孔板，生物素化过敏原与血清中的特异性抗体结合的同时，生物素和链霉亲和素结合，从而使过敏原-特异性抗体复合物固定于微孔板上，实现包被和反应的同步进行。通过一个检测试剂盒提供多种项目组合，满足患者个性化的检测需求。提高了检测试剂的通用性和利用率，避免无关项目的检测和试剂浪费。

