



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110850101 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911173362.X *C07C 271/22*(2006.01)  
 (22)申请日 2019.11.26 *C07C 227/20*(2006.01)  
 (71)申请人 南京工业大学 *C07C 229/26*(2006.01)  
*C07C 229/76*(2006.01)

地址 210000 江苏省南京市浦口区浦珠南路30号南京工业大学江浦校区

(72)发明人 余昌敏 韩希思 李林 魏继福  
曹梦姐 张飞 吴琼 张承武

(74)专利代理机构 南京先科专利代理事务所  
(普通合伙) 32285

代理人 叶帅东

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/68*(2006.01)  
*G01N 33/558*(2006.01)  
*G01N 33/535*(2006.01)  
*C07C 269/06*(2006.01)

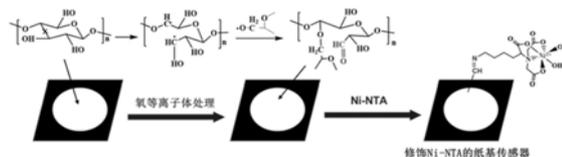
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用。该纸基传感器利用修饰镍-氨三乙酸的纸基材料作为载体,通过镍-氨三乙酸与组氨酸标签之间的相互作用将重组过敏原蛋白固定到纸上。然后利用抗原-抗体特异性反应捕获血清中的特异性免疫球蛋白E (sIgE),通过结合酶标二抗产生化学发光。将化学发光信号与sIgE浓度相关联,实现对血清样本中sIgE的定量检测。本方法具有检测限低、特异性高、成本低、效率高以及可以实现定量检测等优势,其检测限低于临床诊断的临界值。此外,本发明能在过敏原组分水平上定量检测血清中的sIgE,将过敏研究置于精准医疗的水平,对临床上建立诊断过敏反应的系统具有重要意义。



1. 一种纸基传感器,其特征在於,所述纸基传感器的制备方法,包括以下步骤:步骤1,利用等离子清洗机将层析纸处理,使层析纸表面产生醛基;步骤2,利用蜡打印技术在纸上形成检测微区,并将打印好的层析纸置于烘箱中烘烤,使蜡熔化并穿透纸张厚度,形成亲水-疏水壁垒;步骤3,在层析纸的检测区域滴加镍-氨三乙酸,室温下放置,直至干透,即得纸基传感器;所述纸基传感器的检测特异性免疫球蛋白E的最低检测限为0.51 ng/mL。

2. 根据权利要求1所述的一种纸基传感器,其特征在於,步骤1中等离子清洗机工作参数为工作电源13.56 MHz,射频功率为100 W,处理时间为3-5 min;步骤2中烘烤温度为100 °C,时间90 s,检测区为直径3-6 mm的圆孔,以12列× 8行的形式排列,边缘为亲疏水通道。

3. 根据权利要求1所述的一种纸基传感器,其特征在於,步骤3中镍-氨三乙酸的制备方法如下:第一步,0 °C下,将0.5-2 g N-碳苄氧基赖氨酸和1.05-2.1 g溴乙酸按摩尔比为1:3.5-5溶解于2 M的氢氧化钠溶液中,再加入到烧瓶中,混合均匀后室温下搅拌1.5-3 h,然后加热到50 °C反应15-20 h,0 °C下,将浓盐酸加入到反应后的溶液中,形成沉淀,减压过滤形成白色粉末;将所述白色粉末溶解于甲醇中,加入质量分数10%的钯碳,将烧瓶中充满氢气,反应混合物在室温下搅拌10-16 h,将溶液在减压条件下过滤去除钯碳得到氨三乙酸;第二步,取0.5-1 g合成的氨三乙酸与2-4 mL的1 M的氯化镍溶解于去离子水中,按摩尔比1:1-2反应,室温下在摇床上摇晃0.5-2 h,得到Ni-NTA。

4. 根据权利要求1所述的一种纸基传感器,其特征在於,第一步中N-碳苄氧基赖氨酸与溴乙酸的摩尔比为1:3.5-5,N-碳苄氧基赖氨酸以1 mL/min的速度缓慢滴加到溴乙酸溶液。

5. 基于权利要求1所述的纸基传感器在建立快速定量检测特异性免疫球蛋白系统上的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,包括以下步骤:

步骤i,利用修饰Ni-NTA的纸基传感器作为载体,连接带有组氨酸标签的重组过敏原蛋白,室温孵育后,再用磷酸盐缓冲液清洗,去除未结合物,所述Ni-NTA的体积为2.5-10 μL,重组过敏原蛋白的体积为1.5-6 μL;

步骤ii,向步骤i中结合重组过敏原蛋白的纸基传感器中滴加含有sIgE的血清样本,室温孵育后,用磷酸盐缓冲液冲洗,去除未结合物,所述血清样本的体积为1.5-6 μL;

步骤iii,向步骤ii的滴加sIgE的血清样本的纸基传感器中加入辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育,再用磷酸盐缓冲液清洗,去除未结合物,再加入曝光液实现化学发光,实现对血清样本中sIgE的特异性检测,所述酶标二抗的体积为1.5-6 μL;

步骤iv,构建血清样本中sIgE浓度与化学发光强度相关的标准曲线;

步骤v,利用制备得到的纸基传感器检测真实血清样本,根据其化学发光强度在标准曲线上找到对应的sIgE的浓度,实现定量检测。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,步骤i中所述重组过敏原蛋白为狗毛过敏原组分Can f 1,Ni-NTA与重组过敏原蛋白的体积比为1:0.4-2。

8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,步骤ii中重组过敏原蛋白与含sIgE的血清样本的体积比为1:0.4-2,室温下孵育5-10 min,pH为7.4的磷酸盐缓冲液的浓度是0.01 mol/L,清洗2-4次,每次5-20 μL。

9. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,步骤iii中含sIgE的血清样本与酶标二抗

的体积比为1:0.4-2,室温下孵育5-10 min,pH为7.4的磷酸盐缓冲液的浓度是0.01 mol/L,清洗2-4次,每次5-20  $\mu$ L。

10.根据权利要求6所述的应用,其特征在于,步骤iv中标准曲线的线性方程为 $Y = 9.63X + 33.676$ ,其中,Y为发光强度,X为过敏病人血清中的sIgE浓度。

## 一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用,属于材料与生物医学交叉领域。

### 背景技术

[0002] 过敏性疾病是世界六大疾病之一,全球超过25%的人患有过敏性疾病。近年来,我国自然生态环境不断恶化,雾霾等恶劣天气时常发生,人们接触到致敏物质的概率不断增加,导致我国过敏性疾病的发生率达到30%左右,发病人数排名全球第一。过敏患者常伴有打喷嚏、咳嗽、瘙痒、皮肤肿胀、鼻窦疼痛和呼吸短促等症状,严重者甚至会引起死亡。因此,过敏疾病给患者的生活带来极大的痛苦,已成为现代社会的一个主要健康问题。

[0003] 过敏是免疫机制诱发的超敏反应,通常可由抗体或细胞介导。对于大多数具有呼吸道、胃肠道或皮肤过敏症状的患者,导致其过敏反应的抗体为免疫球蛋白抗体。因此,目前临床诊断过敏主要基于体外血清特异性免疫球蛋白E(specific Immunoglobulin E, sIgE)检测,其中蛋白芯片、酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)等已被认为是体外定性检测过敏的常用方法。然而,这些方法所用的过敏原标准品主要是粗提物,其存在严重缺陷:(1)来源和含量不易标准化,难以区分真实致敏蛋白和其他过敏原,影响诊断的特异性;(2)只能诊断是否过敏,而不能提供具体致敏蛋白的信息;(3)某些过敏原蛋白在粗提物中由于含量较低而难以检测,导致假阴性结果,影响后续免疫治疗。

[0004] 为了克服上述缺陷,基于重组过敏原蛋白的组分解析(Component Resolved Diagnosis, CRD)已成为过敏性疾病诊断和治疗的热点。不同于传统诊断方法中使用的过敏原粗提物,组分解析诊断使用纯化的天然或重组过敏原蛋白,其优点在于:(1)能够准确诊断出具体的致敏蛋白;(2)使用该致敏蛋白作为脱敏治疗试剂,避免粗提物中非致敏蛋白可能导致的副作用;(3)精确了解过敏原交叉的情况,预测其他可能的过敏原,从而帮助医师优化免疫治疗方案,提升治疗效果。

[0005] 免疫吸附试验(ImmunoCAP)作为体外诊断过敏性疾病的“金标准”,具有可靠的重复性和精确性,能够基于组分解析实现对血清中sIgE的定量检测,对临床判断过敏疾病的严重程度具有指导意义,协助精准治疗。但是,ImmunoCAP由于成本昂贵而难以大范围推广。此外,ImmunoCAP对血清中sIgE的特异性检测受限于载体上固定的过敏原蛋白种类,而目前商业化的ImmunoCAP的载体也仅能固定几种过敏原蛋白,检测受到很大限制。因此,需要开发一种新的技术手段,如优化重组过敏原蛋白的固定方式等来解决这些问题。

[0006] 大量研究表明,使用高亲和力的固定化标签可以避免蛋白质直接附着在载体表面,从而解决目标蛋白的固定覆盖sIgE结合位点的问题。镍-氨三乙酸(Ni-nitrilotriacetate, Ni-NTA)是一种具有良好的物理、化学稳定性质的络合物,且由于金属离子Ni<sup>2+</sup>能够与蛋白表面的一些特殊的氨基酸发生相互作用,因此Ni-NTA能够与含组氨酸(6×His)标签的蛋白特异性结合而不覆盖sIgE表位,从而准确识别sIgE,提高检测灵敏度。

这一相互作用已被广泛用于蛋白质纯化,但目前还未应用于制备诊断过敏性疾病的产品上。

[0007] 除了过敏原蛋白的固定外,血清样品的检测耗时、昂贵,因此迫切需要开发一种低成本、高效率的载体实现对sIgE的检测。纸基微流控是目前广泛应用并不断发展的技术,它是由Whitesides和同事在2007年首次提出的概念,又被称为“纸上实验室”。该技术具有成本低、简单、便携、生物相容性好等优点,已经成功应用于比色法、电化学分析法、生物样品分析等领域,为生命科学和生物技术提供了更多的可能。

[0008] 申请号201711065498.X公开了Pru p 3蛋白在制备蒿花粉相关桃过敏检测试剂盒中的应用。该方法采用Pru p 3蛋白制备的试剂盒,联合嗜碱性粒细胞活化试验用于预测蒿花粉相关桃过敏反应,其预测效果优于目前临床最常用的体外检测方法即桃及其组分sIgE的检测效果,其可有效区分交叉反应导致的桃致敏和桃过敏患者,采用Pru p 3蛋白制备的试剂盒进行的检测是用于预测蒿花粉相关桃过敏反应发生的最佳体外检测方法,具有最佳的灵敏度和特异度。但是,该专利通过对嗜碱性粒细胞表面CD63表达水平的检测,仅实现了预测蒿花粉相关桃过敏反应的发生,并未能实现定量检测。

[0009] 申请号201610134578.5公开了一种血清特异性IgE光激化化学发光免疫分析试剂盒。该发明采用已明确的单一组分过敏原(天然或重组制备)包被发光微球,以生物素标记抗人IgE抗体,与链霉亲合素预包被感光微球组成检测试剂。首先,待检血清、过敏原包被的发光微球、生物标记抗人IgE抗体共同温育,待检血清中特异性IgE抗体分别结合发光微球表面的抗原分子和生物素标记抗人IgE抗体;其次,加入预先包被有链霉亲合素的感光微球并继续温育,通过生物素与链霉亲合素结合;最后,用光激化学发光分析仪检测光信号强度。然而,该方法检测约为1h,检测时间比较长,且该专利采用单一组分包被发光微球,其中过敏原的活性位点可能会被发光微球遮挡,导致蛋白的活性降低或与血清中sIgE的结合能力下降,影响检测的特异性和准确性。

## 发明内容

[0010] 针对临床上现有的过敏检测技术耗时长、成本高、效率低且灵敏度差等问题,提出了一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用,通过在纸基载体上引入酶联免疫反应技术,即借助一种纸基传感器来定量检测血清中的特异性免疫球蛋白,从而实现了对过敏反应的检测,为临床建立诊断过敏疾病系统提供了一个广阔的平台。

[0011] 一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器,所述纸基传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 步骤1,利用等离子清洗机将层析纸处理,使层析纸表面产生醛基;

[0013] 步骤2,利用蜡打印技术在纸上形成检测微区,并将打印好的层析纸置于烘箱中烘烤,使蜡熔化并穿透纸张厚度,形成亲水-疏水壁垒;

[0014] 步骤3,在层析纸的检测区域滴加镍-氨三乙酸(Ni-NTA),室温下放置直至干透,即得纸基传感器;所述纸基传感器的检测特异性免疫球蛋白E的最低检测限为0.51ng/mL。

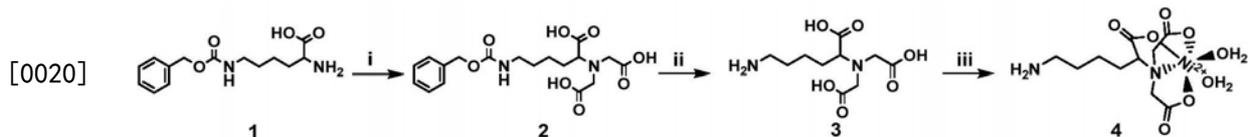
[0015] 作为改进的是,步骤1中等离子清洗机工作参数为工作电源13.56MHZ,射频功率为100W,处理时间为3-5min;步骤2中烘烤温度为100℃,时间90s,检测区为直径3-6mm的圆孔,以12列×8行的形式排列,边缘为亲疏水通道。

[0016] 作为改进的是,步骤3中Ni-NTA的制备方法如下:

[0017] 第一步,0℃下,将0.5-2g N-碳苄氧基赖氨酸和1.05-2.1g溴乙酸按摩尔比为1:3.5-5溶解于氢氧化钠中,再加入到烧瓶中,混合均匀后室温下搅拌1.5-3h,然后加热到50℃反应15-20h,0℃下,将浓盐酸加入到反应后的溶液中,形成沉淀,减压过滤形成白色粉末,将所述白色粉末溶解于甲醇中,加入质量分数10%的钯碳,向烧瓶中充满氢气,反应混合物在室温下搅拌10-16h,将溶液在减压条件下过滤去除钯碳得到NTA;

[0018] 第二步,取0.5-1g氨三乙酸与2-4mL的1M的氯化镍溶解于去离子水中,按摩尔比1:1-2反应,室温下在摇床上摇晃0.5-2h,得到Ni-NTA。

[0019] 上述反应式如下所示:



[0021] 进一步改进的是,第一步中N-碳苄氧基赖氨酸与溴乙酸的摩尔比为1:3.5-5,N-碳苄氧基赖氨酸以1mL/min的速度缓慢滴加到溴乙酸中,否则会导致反应不完全。

[0022] 上述纸基传感器在建立快速定量检测特异性免疫球蛋白系统上的应用。

[0023] 上述应用,包括以下步骤:

[0024] 步骤i,利用修饰Ni-NTA的纸基传感器作为载体,连接带有组氨酸标签的重组过敏原蛋白,室温孵育后,再用磷酸盐缓冲液清洗,去除未结合物,所述Ni-NTA的体积为2.5-10μL,重组过敏原蛋白的体积为1.5-6μL;

[0025] 步骤ii,向步骤i中结合重组过敏原蛋白的纸基传感器中滴加含有sIgE的血清样本,室温孵育后,用磷酸盐缓冲液冲洗,去除未结合物,所述血清样本的体积为1.5-6μL;

[0026] 步骤iii,,向步骤ii的滴加sIgE的血清样本的纸基传感器中加入辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育,再用磷酸盐缓冲液清洗,去除未结合物,再加入曝光液实现化学发光,实现对血清样本中sIgE的特异性检测,所述酶标二抗的体积为1.5-6μL;

[0027] 步骤iv,构建血清样本中sIgE浓度与化学发光强度相关的标准曲线;

[0028] 步骤V,利用制备得到的纸基传感器检测真实血清样本,根据其化学发光强度在标准曲线上找到对应的sIgE的浓度,实现定量检测。

[0029] 作为改进的是,步骤i中所述重组过敏原蛋白为狗毛过敏原组分Can f 1,Ni-NTA与重组过敏原蛋白的体积比为1:0.4-2。

[0030] 作为改进的是,步骤ii中重组过敏原蛋白与含sIgE的血清样本的体积比为1:0.4-2,室温下孵育5-10min,pH为7.4的磷酸盐缓冲液的浓度是0.01mol/L,清洗2-4次,每次5-20μL。

[0031] 作为改进的是,步骤iv中标准曲线的线性方程为 $Y=9.63X+33.676$ ,其中,Y为发光强度,X为过敏病人血清中的sIgE浓度。

[0032] 有益效果:

[0033] 与现有技术相比,本发明提出了一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用,该纸基传感器通过对纸基修饰处理后,通过特异性结合含组氨酸标签的重组过敏原蛋白,实现对sIgE快速、高效的定量检测。与目前临床变应原固定模型相比,通过His标签与Ni-NTA相互作用将重组过敏原固定到纸上的模式与体内过敏原和sIgE的真实结合

模式更为一致,因此检测更具有灵敏性和准确性。

[0034] 与ImmunoCAP技术相比,该发明:(1)具有所需样品量少、时间短、成本低等优点;(2)具有不受过敏原蛋白种类限制的优势,只需改变结合的重组过敏原蛋白种类,即可对相应的过敏血清样本进行检测,检测范围更广。此外,利用重组过敏原蛋白定量检测血清中的sIgE,具有极佳的灵敏度和特异性,可有效区分过敏原中的真实致敏和非致敏组分。而且,通过在过敏原组分水平上定量检测血清中的sIgE,将过敏研究置于精准医疗的水平,对人类的健康发展有巨大的帮助,对后续脱敏治疗有重要意义。

### 附图说明

[0035] 图1为一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器的制备;

[0036] 图2为基于过敏原组分解析的特异性免疫球蛋白的检测流程;

[0037] 图3为化学发光强度与不同来源的血清样本之间的关系(样本1-7分别为对螨虫、花粉等过敏原过敏的病人血清样本);

[0038] 图4为化学发光强度与不同sIgE浓度血清样本的定性观察(a)与定量曲线(b),其中,(a)为血清样本对应的化学发光成像图,(b)为根据sIgE浓度对应的化学发光强度值作出的标准曲线。

### 具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例对本发明作进一步描述。

[0040] 实施例1

[0041] 一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器,所述纸基传感器的制备方法包括如下步骤:

[0042] 步骤1:利用工作电源为13.56MHZ、射频功率为100W的等离子清洗机对层析纸处理4min,使纸表面产生醛基;

[0043] 步骤2:利用蜡打印技术在纸上打印出直径3mm,以12列×8行的形式排列的圆孔作为检测区,并将打印好的层析纸置于100℃烘箱中烘烤90s,使蜡熔化并穿透纸张厚度,形成亲水-疏水壁垒;

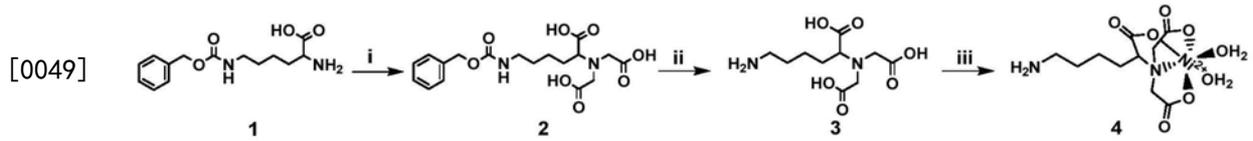
[0044] 步骤3:在层析纸的检测区域滴加2.5μL的Ni-NTA,室温下放置直至干透,即得纸基传感器。

[0045] 其中,Ni-NTA的制备方法,如下:

[0046] (1)NTA:0℃下,将1g的N-碳苄氧基赖氨酸和1.6g的溴乙酸溶解于氢氧化钠中,再加入到烧瓶中,混合均匀后室温下搅拌1.5h,然后加热到50℃反应15h,0℃下,将浓盐酸加入到反应后的溶液中,形成沉淀,减压过滤形成白色粉末。将所述白色粉末溶解于甲醇中,加入质量分数10%的钯碳,向烧瓶中充满氢气,反应混合物在室温下搅拌10h,将溶液在减压条件下过滤去除钯碳得到NTA;

[0047] (2)Ni-NTA:取所述0.5g氨三乙酸与2mL的1M的氯化镍溶解于去离子水中,室温下在摇床上摇晃2h,得到Ni-NTA。

[0048] 反应式如下所示:



[0050] 上述纸基传感器在建立快速定量检测特异性免疫球蛋白系统上的应用。

[0051] 所述应用,包括以下步骤:

[0052] (1) 利用修饰Ni-NTA的纸基传感器作为载体,向纸基传感器的每个孔中滴加6 $\mu$ L含组氨酸标签的重组过敏原蛋白,室温孵育5min,再用10 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物;

[0053] (2) 向每个孔中滴加6 $\mu$ L含有sIgE的血清样本室温孵育10min,并用10 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物;

[0054] (3) 向每个孔中加入6 $\mu$ L辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育5min,并用10 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物检测,再加入曝光液实现化学发光,实现对血清样本中sIgE的特异性检测。

[0055] 实施例2

[0056] 一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器,所述纸基传感器的制备方法包括如下步骤:

[0057] 步骤1:利用工作电源为13.56MHz、射频功率为100W的等离子清洗机对层析纸处理3min,使纸表面产生醛基;

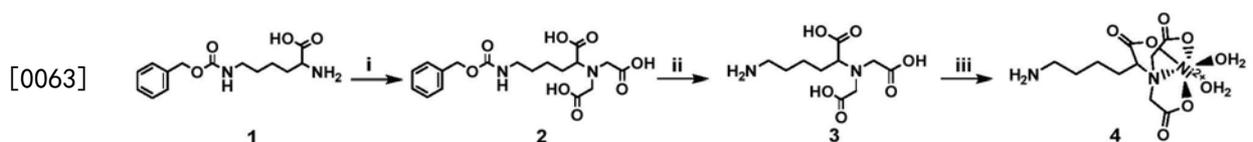
[0058] 步骤2:利用蜡打印技术在纸上打印出直径6mm,以12列 $\times$ 8行的形式排列的圆孔作为检测区,并将打印好的层析纸置于100 $^{\circ}$ C烘箱中烘烤90s,使蜡熔化并穿透纸张厚度,形成亲水-疏水壁垒;

[0059] 步骤3:在层析纸的检测区域滴加10 $\mu$ L的Ni-NTA,室温下放置直至干透,即得纸基传感器。

[0060] 其中,Ni-NTA的制备方法,如下:

[0061] (1) NTA:0 $^{\circ}$ C下,将2g的N-碳苄氧基赖氨酸和2.1g的溴乙酸溶解于氢氧化钠中,再加入到烧瓶中,混合均匀后室温下搅拌3h,然后加热到50 $^{\circ}$ C反应18h,0 $^{\circ}$ C下,将浓盐酸加入到反应后的溶液中,形成沉淀,减压过滤形成白色粉末。将所述白色粉末溶解于甲醇中,加入质量分数10%的钡碳,向烧瓶中充满氢气,反应混合物在室温下搅拌16h,将溶液在减压条件下过滤去除钡碳得到NTA;

[0062] (2) Ni-NTA:取所述1g氨三乙酸与3mL的1M的氯化镍溶解于去离子水中,室温下在摇床上摇晃2h,得到Ni-NTA,反应式如下:



[0064] 上述纸基传感器在建立快速定量检测特异性免疫球蛋白系统上的应用。

[0065] 上述应用,包括以下步骤:

[0066] (1) 利用修饰Ni-NTA的纸基传感器作为载体,向纸基传感器的每个孔中滴加3 $\mu$ L含组氨酸标签的重组过敏原蛋白,室温孵育10min,再用20 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三

次,洗去未结合物;

[0067] (2) 向每个孔中滴加3 $\mu$ L含有sIgE的血清样本室温孵育20min,并用20 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物;

[0068] (3) 向每个孔中加入3 $\mu$ L辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育10min,并用20 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物,再加入曝光液产生化学发光,实现对血清样本中sIgE的特异性检测。

[0069] 实施例3

[0070] 一种定量检测血清中sIgE的纸基传感器,所述纸基传感器的制备方法包括如下步骤:

[0071] 步骤1:利用工作电源为13.56MHZ、射频功率为100W的等离子清洗机对层析纸处理5min,使纸表面产生醛基;

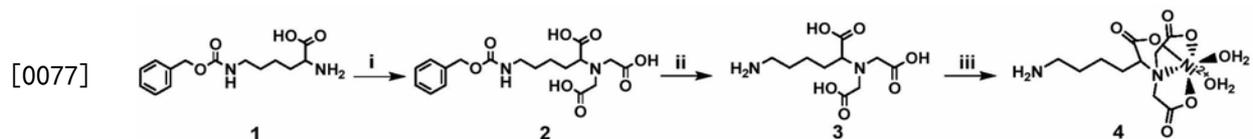
[0072] 步骤2:利用蜡打印技术在纸上打印出直径4mm,以12列 $\times$ 8行的形式排列的圆孔作为检测区,并将打印好的层析纸置于100 $^{\circ}$ C烘箱中烘烤90s,使蜡熔化并穿透纸张厚度,形成亲水-疏水壁垒;

[0073] 步骤3:在层析纸的检测区域滴加5 $\mu$ L的Ni-NTA,室温下放置直至干透,即得纸基传感器。

[0074] 其中,Ni-NTA的制备方法,如下:

[0075] (1) NTA:0 $^{\circ}$ C下,将0.5g的N-碳苄氧基赖氨酸和1.05g的溴乙酸溶解于氢氧化钠中,再加入到烧瓶中,混合均匀后室温下搅拌3h,然后加热到50 $^{\circ}$ C反应20h,0 $^{\circ}$ C下,将浓盐酸加入到反应后的溶液中,形成沉淀,减压过滤形成白色粉末。将所述白色粉末溶解于甲醇中,加入质量分数10%的钯碳,向烧瓶中充满氢气,反应混合物在室温下搅拌13h,将溶液在减压条件下过滤去除钯碳得到NTA;

[0076] (2) Ni-NTA:取所述0.75g氨三乙酸与4mL的1M的氯化镍溶解于去离子水中,室温下在摇床上摇晃0.5h,得到Ni-NTA,反应式如下:



[0078] 上述纸基传感器在建立快速定量检测特异性免疫球蛋白系统上的应用。

[0079] 所述应用,包括以下步骤:

[0080] (1) 利用修饰Ni-NTA的纸基传感器作为载体,向纸基传感器的每个孔中滴加1.5 $\mu$ L含组氨酸标签的重组过敏原蛋白,室温孵育5min,再用5 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物;

[0081] (2) 向每个孔中滴加1.5 $\mu$ L含有sIgE的血清样本室温孵育30min,并用5 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物;

[0082] (3) 向每个孔中加入1.5 $\mu$ L辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育5min,并用5 $\mu$ L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗三次,洗去未结合物,再加入曝光液产生化学发光,实现对血清样本中sIgE的特异性检测。

[0083] 实施例4

[0084] 利用实施例2制备的纸基传感器,对其他过敏原提取物过敏的患者的血清样本(样

本1-7分别为对螨虫、花粉、猫毛等过敏原过敏的病人血清样本)进行检测,以不含sIgE的血清样本作为空白样本,评估纸基装置的检测选择性。

[0085] 所有血清样本均经商业ImmunoCAP验证。如果血清样本中含有抗Can f 1的sIgE抗体,则可以检测到阳性信号。而如图3所示,除了Can f 1样本外,对其他过敏原提取物过敏的患者的血清样本的检测结果均呈阴性,这一结果证明了基于组分解析的特异性免疫球蛋白定量检测方法的高特异性。

[0086] 实施例5

[0087] 上述纸基传感器在建立快速定量检测特异性免疫球蛋白系统上的应用。

[0088] 其标准曲线的构建与最低检测限 (LOD) 的测定:

[0089] (1) 将已知浓度的血清样品 (由ImmunoCAP测定) 作为标准品,配置成4种浓度分别为:0、2.52、7.4、14.02ng/mL的血清样品,按照实施例步骤对样本进行分析。首先利用纸基传感器作为载体,固定重组过敏原蛋白,再依次加入血清样本和酶标二抗孵育,实现化学发光,用凝胶成像仪检测化学发光强度,化学发光强度图如图4 (a) 所示;

[0090] (2) 利用Image J将化学发光强度转化为数值,构建sIgE浓度与化学发光强度的标准曲线。如图4 (b) 所示,在0-14.2ng/mL范围内,标准曲线呈良好的线性关系。所述方法的线性方程为: $Y=9.63X+33.676$ , $R^2=0.992$ 。LOD为空白样本标准偏差值的3倍计算而得,经测定为0.51ng/mL。

[0091] 实施例6

[0092] 上述定量检测血清中sIgE的纸基传感器在快速定量检测特异性免疫球蛋白上的应用。

[0093] 其在真实样本中回收率的计算:

[0094] 检测方法的回收率通过以下方法评价:随机选取3份确定浓度的病人血清样本 (详细信息如表1所示),其浓度分别为0、2.52、7.42ng/mL。接着,向3份血清样本中加入一系列已知浓度的血清样本,计算此时每个样本中sIgE浓度值,即为理论值。然后按照实施例中的分析方法对血清样本进行检测,将检测得到的化学发光强度代入标准曲线计算对应的sIgE浓度,该浓度即为实际检测值。

[0095] 表1真实血清样本的回收率验证

样本	年龄	症状	确定浓度 (ng/mL)	sIgE 浓度 (ng/mL)			
				添加浓度 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实际浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
孙xx	45	过敏性鼻炎伴哮喘	0	-	-	-	-
				2.057	2.057	1.941	94.4
				6.192	6.192	5.692	91.9
				11.681	11.681	12.051	103.2
汪xx	60	变应性鼻炎	2.520	-	-	-	-
				2.057	4.577	4.473	97.7
				6.192	8.712	9.445	108.4
				11.681	14.201	15.327	107.9
周x	25	过敏性鼻炎伴哮喘	7.416	-	-	-	-
				2.057	9.473	10.094	106.6
				6.192	13.608	15.066	110.7
				11.681	19.097	20.395	106.8

[0097] 检测浓度与添加后的实际浓度的比值即为回收率,其范围在91.9-110.7%之间

(如表1所示),证明本方法具有良好的检测准确性。

[0098] 与申请号201711065498.X相比,本专利能够定量检测血清样本中sIgE的浓度,精确度更高。与申请号201610134578.5相比,本专利检测所需时间短,且活性位点多,检测准确率高。

[0099] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

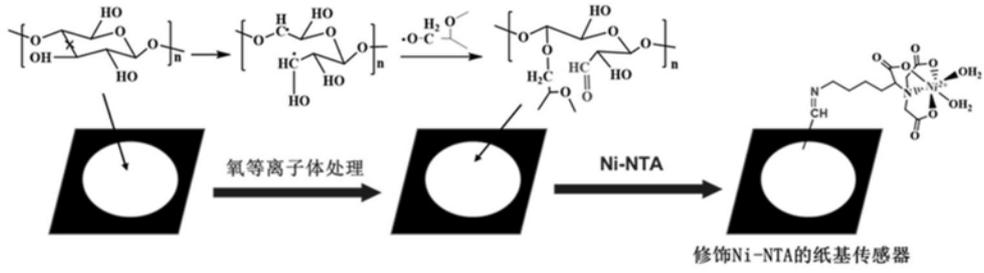


图1

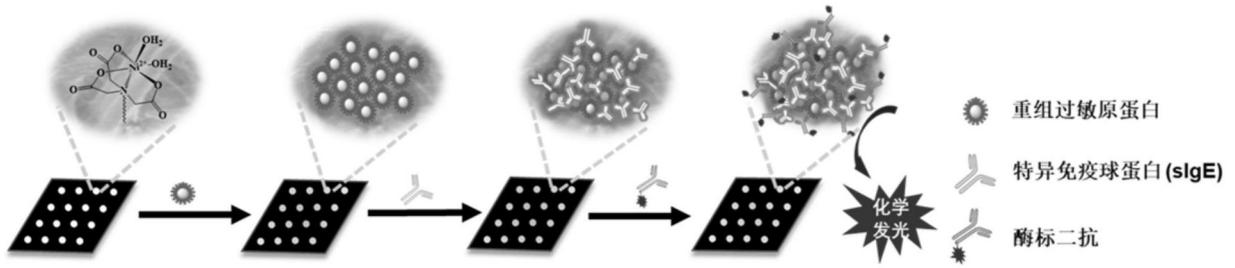


图2

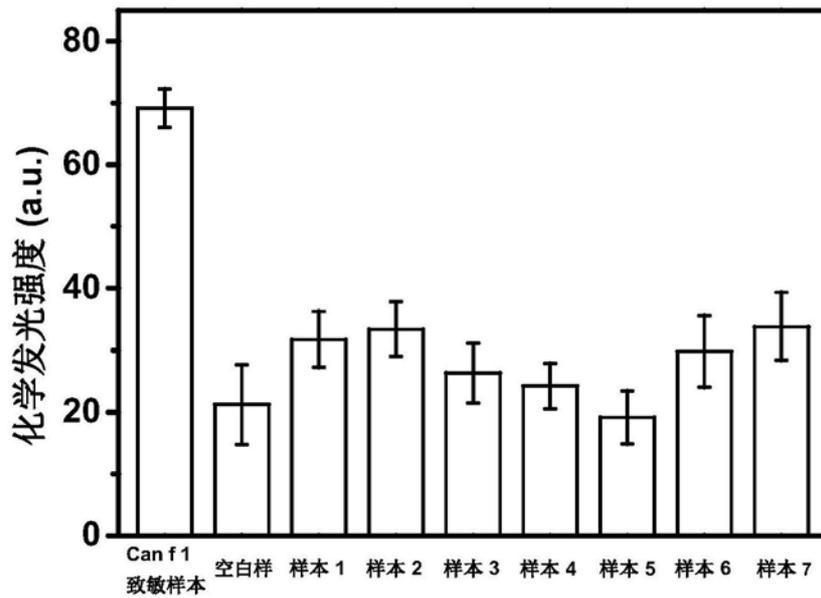


图3

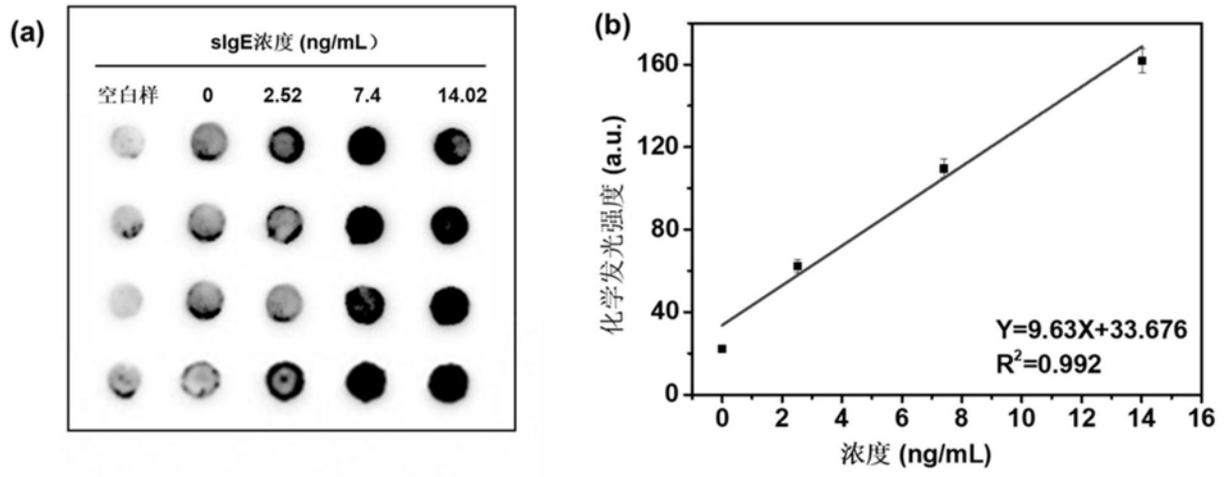


图4

专利名称(译)	一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110850101A</a>	公开(公告)日	2020-02-28
申请号	CN201911173362.X	申请日	2019-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	余昌敏 韩希思 李林 魏继福 曹梦妲 张飞 吴琼 张承武		
发明人	余昌敏 韩希思 李林 魏继福 曹梦妲 张飞 吴琼 张承武		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/535 C07C269/06 C07C271/22 C07C227/20 C07C229/26 C07C229/76		
CPC分类号	C07C227/20 C07C229/76 C07C269/06 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/6854 C07C271/22 C07C229/26		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种快速定量检测特异性免疫球蛋白的纸基传感器及其应用。该纸基传感器利用修饰镍-氨三乙酸的纸基材料作为载体，通过镍-氨三乙酸与组氨酸标签之间的相互作用将重组过敏原蛋白固定到纸上。然后利用抗原-抗体特异性反应捕获血清中的特异性免疫球蛋白E (sIgE)，通过结合酶标二抗产生化学发光。将化学发光信号与sIgE浓度相关联，实现对血清样本中sIgE的定量检测。本方法具有检测限低、特异性高、成本低、效率高以及可以实现定量检测等优势，其检测限低于临床诊断的临界值。此外，本发明能在过敏原组分水平上定量检测血清中的sIgE，将过敏研究置于精准医疗的水平，对临床上建立诊断过敏反应的系统具有重要意义。

