



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102331492 A

(43) 申请公布日 2012.01.25

(21) 申请号 201110158706.7

(22) 申请日 2011.06.14

(71) 申请人 浙江大学

地址 310013 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 赵铖铖

(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 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

一种检测血清中螨虫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螨虫过敏原特异性抗体的方法,包括:将螨虫过敏原与表面羧基修饰的磁性微球偶联,制得免疫磁性微球;将待测血清与免疫磁性微球置于酶标板的孔内混合孵育,使螨虫过敏原与血清中螨虫过敏原特异性IgE结合,洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。本发明将螨虫过敏原直接偶联在磁性微球表面,有利于去除血清中除螨虫过敏原特异性抗体之外的所有杂质,进行针对性的螨虫过敏原特异性抗体检测,缩短了检测时间,提高了检测的灵敏度、特异性和准确性。本发明中制备的螨虫过敏原免疫磁性微球能应用于标准化自动检测,提高检测效率。

1. 一种检测血清中螨虫过敏原特异性抗体的方法,包括:

将螨虫过敏原与表面羧基修饰的磁性微球偶联,制得免疫磁性微球;将待测血清与免疫磁性微球置于酶标板的孔内混合孵育,使螨虫过敏原与血清中螨虫过敏原特异性 IgE 结合,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,所述纳米磁性微球的制备方法为:

(1) 将  $\text{FeCl}_2$  溶液和  $\text{FeCl}_3$  溶液混合,在氮气保护下搅拌,升温至  $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ,保持  $10 \sim 20\text{min}$ ,调节 pH 值到  $10 \sim 12$ ,升温至  $60 \sim 70^\circ\text{C}$ ,搅拌  $30 \sim 60\text{min}$ ,加入重量浓度为  $1 \sim 10\%$  的油酸钠溶液,升温至  $90 \sim 100^\circ\text{C}$ ,搅拌,制得油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体;

(2) 将油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体聚乙二醇、乙醇和水均匀混合,在氮气保护下搅拌,依次加入过氧化苯甲酰、二乙烯苯和单体苯乙烯、丙烯酸,搅拌  $30 \sim 60\text{min}$ 。升温到  $70 \sim 80^\circ\text{C}$ ,保持 10 小时以上,分离,洗涤。

3. 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  $10 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$  螨虫过敏原。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的磁性微球与螨虫过敏原偶联前磁性微球需经交联剂活化。

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,所述免疫磁性微球与待测血清的重量体积比为  $1 \mu\text{g} : 1 \sim 100 \mu\text{L}$ 。

## 一种检测血清中螨虫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螨虫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, -NH<sub>2</sub> 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] 将螨虫过敏原与表面羧基修饰的磁性微球偶联,制得免疫磁性微球;将待测血清与免疫磁性微球置于酶标板的孔内混合孵育,使螨虫过敏原与血清中螨虫过敏原特异性 IgE 结合,洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。

[0008] 所述纳米磁性微球的制备方法为:

[0009] (1) 将  $\text{FeCl}_2$  溶液和  $\text{FeCl}_3$  溶液混合,在氮气保护下搅拌,升温至  $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ,保持  $10 \sim 20\text{min}$ ,调节 pH 值到  $10\sim 12$ ,升温至  $60 \sim 70^\circ\text{C}$ ,搅拌  $30 \sim 60\text{min}$ ,加入重量浓度为  $1 \sim 10\%$  的油酸钠溶液,升温至  $90 \sim 100^\circ\text{C}$ ,搅拌,制得油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体;

[0010] (2) 将油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体聚乙二醇、乙醇和水均匀混合,在氮气保护下搅拌,依次加入过氧化苯甲酰、二乙烯苯和单体苯乙烯、丙烯酸,搅拌  $30 \sim 60\text{min}$ 。升温到  $70 \sim 80^\circ\text{C}$ ,保持 10 小时以上,分离,洗涤。

[0011] 每毫克磁性微球偶联  $10 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$  螨虫过敏原。

[0012] 所述的免疫磁性微球与待测血清混合前经交联剂活化。所述交联剂为 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。

[0013] 所述免疫磁性微球与待测血清的重量体积比为  $1 \mu\text{g} : 1 \sim 100 \mu\text{L}$ 。

[0014] 本发明将螨虫过敏原直接偶联在磁性微球表面,有利于去除血清中除螨虫过敏原特异性抗体之外的所有杂质,进行针对性的螨虫过敏原特异性抗体检测,缩短了检测时间,提高了检测的灵敏度、特异性和准确性。本发明中制备的螨虫过敏原免疫磁性微球能应用于标准化自动检测,提高检测效率。

## 附图说明

[0015] 图 1 为实施例 1 羧基修饰的磁性微球的扫描电镜照片;

[0016] 图 2 为实施例 3 酶联免疫吸附检测 OD 值随免疫磁性微球加入量变化曲线。

[0017] 图 3 为实施例 4 酶联免疫吸附检测 OD 值随与血清中 IgE 浓度之间的变化关系图。

## 具体实施方式

[0018] 实施例 1

[0019] 使用常规的化学共沉淀法制备油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体:用超纯水配制  $0.12\text{mol/L}$  的氯化亚铁 ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 和  $0.2\text{mol/L}$  的氯化铁 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 各  $25\text{mL}$ ,转移到  $250\text{mL}$  三口烧瓶中,在氮气保护下搅拌,搅拌速度  $500\text{rpm}$ 。将上述混合物温度升至  $55^\circ\text{C}$   $15\text{min}$  后,迅速加入  $3\text{mol/LNaOH}$ ,调节 pH 值到  $10\sim 12$ 。将混合物的温度升至  $65^\circ\text{C}$ ,维持转速搅拌  $40\text{min}$ 。然后缓慢加入  $4\%$  油酸钠  $50\text{mL}$ ,将温度升至  $90^\circ\text{C}$ ,继续搅拌  $30\text{min}$ ,冷却至室温,得到油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体。该磁流体的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒具有超顺磁性,平均粒径为  $30\sim 50\text{nm}$ 。

[0020] 分散聚合法制备羧基修饰的磁性微球:取  $4\text{mL}$  上述油酸钠包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁流体均匀分散在  $10\text{mL}$  超纯水、 $9\text{g}$  聚乙二醇 6000 (PEG6000)、 $35\text{mL}$  乙醇的混合液中,超声分散  $30\text{min}$ ;转移到三口烧瓶中,在氮气保护下搅拌,搅拌速度  $300\text{rpm}$ ,通氮气  $30\text{min}$  以除去氧气,然后

依次加入过氧化苯甲酰 1.6g、偶联剂二乙烯苯 0.1mL 和单体苯乙烯 8mL、丙烯酸 0.8mL,继续搅拌 30min。升温到 75℃,反应持续 10 小时,聚合结束,将混合液冷却至室温。磁分离,用乙醇和超纯水反复洗涤,得到羧基修饰的磁性微球。然后离心分选,保存于含 0.02% (w/v) 叠氮钠的去离子水中。上述过氧化苯甲酰经重结晶,单体均需经减压蒸馏去除阻聚剂后使用。该磁性微球粒径分布在 500nm-2 μ m 左右,约 1 μ m,单分散性良好(图 1)。

#### [0021] 实施例 2

[0022] 偶联螨虫过敏原蛋白,制备免疫磁性微球。

[0023] (1) 使用 25mM MES(pH = 6) 为缓冲液,清洗磁性微球(浓度为 10mg/mL),清洗两次。用上述缓冲液溶解螨虫过敏原蛋白;

[0024] (2) 使用新鲜配制的 EDC 和 NHS 为交联剂,EDC 和 NHS 的浓度为 50mg/mL,向清洗后的磁性微球各加入一定体积的交联剂,每毫克磁性微球各加入 20 μ 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,然后加入适量螨虫过敏原蛋白(磁性微球与螨虫过敏原蛋白的质量比为 15 : 1),漩涡混合,室温下旋转孵育 1-2h;

[0026] (4) 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,室温下旋转孵育 15min,缓冲液清洗 4 次,此缓冲液为含 0.5% (w/v) Tween-20 的 PBS(pH = 7.4);

[0027] (5) 1% 牛血清白蛋白(BSA) 溶液室温下震荡封闭 24h;

[0028] (6) 加入 0.02% (w/v) 的叠氮化钠长期保存。

#### [0029] 实施例 3

[0030] (1) 免疫磁性微球的清洗活化:取上述制备并保存的免疫磁性微球于干净的离心管中,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。

[0031] (2) 样品孵育:取上述清洗活化后的免疫磁性微球(10mg/mL)0.2 μ L、0.5 μ L、1 μ L、2 μ L、4 μ L,各与 100 μ L 标准螨虫血清样品在酶标板各孔中混合,轻轻摇匀,室温下振荡孵育 15-20 分钟。

[0032] (3) 洗板:孵育结束后磁分离,保留上清于新的离心管待检测,每孔各加入 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。

[0033] (4) 每孔分别加入 100 μ L 已经配制好的 HR 酶联二抗溶液,吸打或者轻轻摇晃,与免疫磁性微球混匀,37℃ 温育 45min。

[0034] (5) 洗板:如步骤(3)操作。

[0035] (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。

[0036] (7) 每孔分别加入 100 μ L 终止反应液。

[0037] (8) 使用标准酶标仪在 450nm 波长下测出每孔的吸光度值(OD 值)。

[0038] 如表 2 所示,采用上述操作方法,每一试验结果都来自 3 个重复的平均值。随着免疫磁性微球用量的依次增多,OD 值都有不同程度的依次升高,免疫磁性微球捕获后的上清中 IgE 的含量也依次减少。当用量为 2 μ l 时,上清中仍有 50.2% 的 IgE;当用量上升为

4  $\mu$  l 时, 上清中有 17.1% 的 IgE, 但检测值超出酶标仪可准确测量的范围, 故选用 2  $\mu$  l 作为合适用量。

[0039] 实施例 4

[0040] 户尘螨过敏原特异性 IgE (sIgE) 的检测。用上述实施例 1 制备的磁性微球偶联户尘螨过敏原蛋白, 偶联方法同实施例 2, 每毫克磁性微球偶联 20  $\mu$  g 户尘螨过敏原蛋白, 制成户尘螨过敏原免疫磁性微球, 备用。

[0041] (1) 免疫磁性微球的清洗活化: 取上述户尘螨过敏原免疫磁性微球于干净的离心管中, 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。

[0042] (2) 样品孵育: 取标准户尘螨血清样品稀释浓度为 0.035IU/mL、0.1IU/mL、0.35IU/mL、0.7IU/mL、2.1IU/mL、3.5IU/mL。将免疫磁性微球清洗两次, 分别取 2  $\mu$  L 免疫磁性微球加到酶标板的各孔中, 再各加入 100  $\mu$  L 上述浓度梯度的标准户尘螨血清样品, 吸打混匀; 室温下振荡孵育 15-20min。

[0043] (3) 洗板: 磁分离, 移除上清, 每孔加入 200  $\mu$  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。

[0044] (4) 每孔分别加入 100  $\mu$  L 已经配制好的 HR 酶联二抗, 吸打或者轻轻摇晃, 与免疫磁性微球混匀, 37°C 温育 45min。

[0045] (5) 洗板: 如步骤 (2) 操作。

[0046] (6) 每孔加入 100  $\mu$  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。

[0047] (7) 每孔分别加入 100  $\mu$  L 终止反应液。

[0048] (8) 使用标准酶标仪在 450nm 波长下测出每孔的吸光度值 (OD 值)。

[0049] (9) 结果计算: 以标准溶液系列的吸光度值 (OD 值) 对相应浓度进行线性回归, 获得剂量反应曲线。

[0050] 如图 3 所示, 标准曲线在 IgE 浓度为 0.035IU/mL ~ 3.5IU/mL 之间线性关系良好,  $R^2 = 0.9874$ , 相关系数良好。

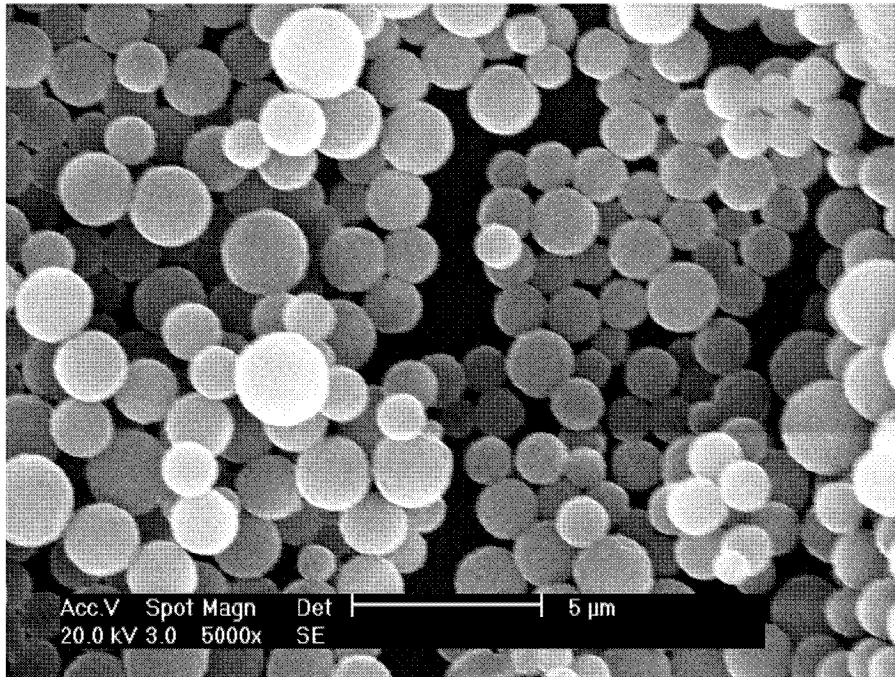


图 1

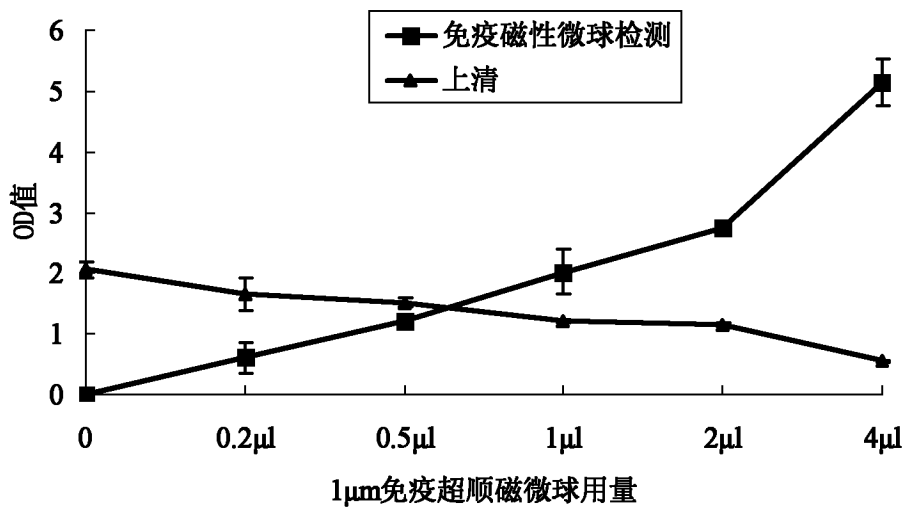


图 2

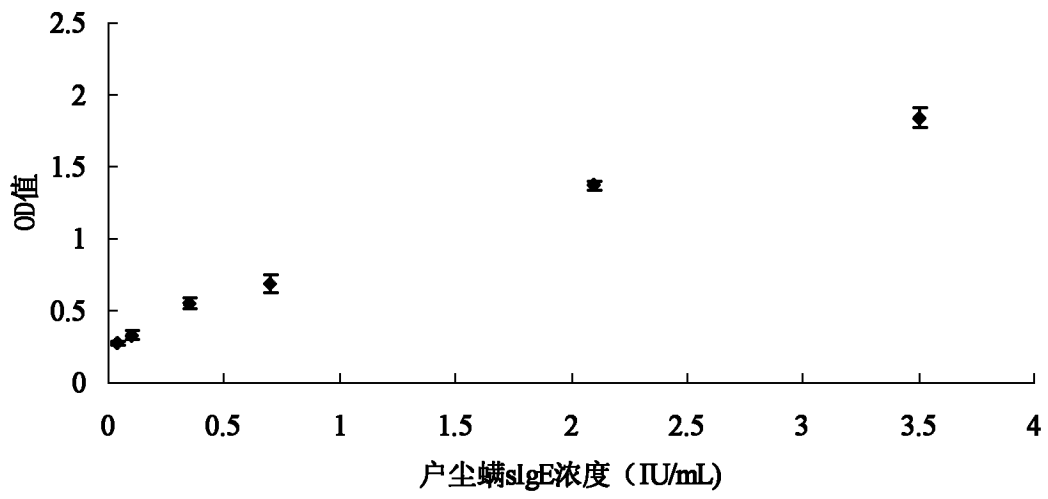


图 3

专利名称(译)	一种检测血清中螨虫过敏原特异性抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102331492A</a>	公开(公告)日	2012-01-25
申请号	CN201110158706.7	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 G01N33/531		
代理人(译)	胡红娟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测血清中螨虫过敏原特异性抗体的方法，包括：将螨虫过敏原与表面羧基修饰的磁性微球偶联，制得免疫磁性微球；将待测血清与免疫磁性微球置于酶标板的孔内混合孵育，使螨虫过敏原与血清中螨虫过敏原特异性IgE结合，洗板后采用酶联免疫吸附法进行检测。本发明将螨虫过敏原直接偶联在磁性微球表面，有利于去除血清中除螨虫过敏原特异性抗体之外的所有杂质，进行针对性的螨虫过敏原特异性抗体检测，缩短了检测时间，提高了检测的灵敏度、特异性和准确性。本发明中制备的螨虫过敏原免疫磁性微球能应用于标准化自动检测，提高检测效率。