



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113125739 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 26

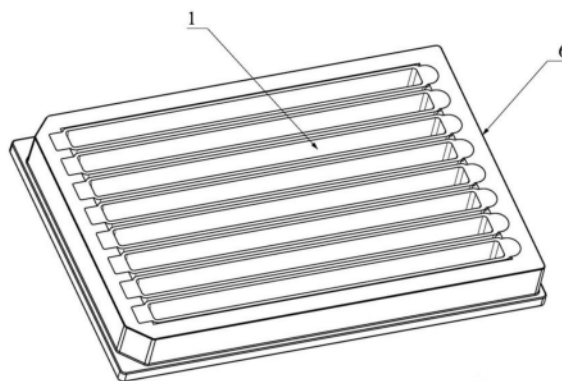
(21) 申请号 202110409320.2
 (22) 申请日 2021.04.16
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113125739 A
 (43) 申请公布日 2021.07.16
 (73) 专利权人 杭州浙大迪迅生物基因工程有限
 公司
 地址 310052 浙江省杭州市滨江区滨康路
 568号2号楼201
 (72) 发明人 吴周杰 刘奕 吴善东 沈华浩
 陈姗姗 吴绍长 王溢飞 朱明芝
 王美杰 陈初含
 (74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
 专利代理师 刘奇

(51) Int. Cl.
 G01N 33/58 (2006.01)
 G01N 33/545 (2006.01)
 G01N 33/68 (2006.01)
 G01N 33/577 (2006.01)
 G01N 33/547 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2014186971 A1, 2014.07.03
 CN 104237527 A, 2014.12.24
 CN 104237523 A, 2014.12.24
 CN 105044326 A, 2015.11.11
 CN 110252432 A, 2019.09.20
 CN 103827670 A, 2014.05.28
 CN 105143856 A, 2015.12.09
 审查员 毛景秀

权利要求书1页 说明书17页 附图3页

(54) 发明名称
 一种荧光芯片定量检测试剂盒

(57) 摘要
 本发明涉及一种荧光芯片定量检测试剂盒，属于蛋白检测技术领域。本发明所述试剂盒包括检测板和荧光微球偶联的检测抗体；所述检测板设有多个反应槽，反应槽设有开口，所述反应槽的内底面沿所述反应槽的长度方向并排间隔设置多个检测位点。本发明所述试剂盒能够高灵敏地检测细胞因子或过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA，并且能够快速定量检测人血清或血浆中的细胞因子浓度，可一次检测十几种细胞因子，也可快速定量检测人血清或血浆中的过敏原蛋白特异性抗体IgE、IgG和IgA的浓度，并可一次筛查几十种过敏原。



1. 一种荧光芯片定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒由检测板和荧光微球偶联的检测抗体组成;所述检测板设有多个反应槽,反应槽设有开口,所述反应槽的内底面沿所述反应槽的长度方向并排间隔设置有多个检测位点;

所述试剂盒的待测物包括细胞因子或过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA,IgG包括IgG4;

所述检测板的材质包括聚苯乙烯;所述反应槽的上端设有开口,所述反应槽的内底面上沿所述反应槽的长度方向并排间隔设置有多个检测位点;所述检测位点为凹槽或凸起柱;

当所述试剂盒的待测物为细胞因子时,所述检测板的检测位点上固定有待测细胞因子特异性单抗,所述荧光微球偶联的检测抗体为荧光微球偶联的待测细胞因子配对抗体;所述待测细胞因子包括IL-1beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12P70、IL-17A、TNF-a、IFN- γ 和IFN- α ;

固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板的制备方法包括以下步骤:

使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板;将待测细胞因子特异性单抗分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测细胞因子特异性单抗;将生物素标记的待测细胞因子特异性单抗分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板;

当所述试剂盒的待测物为过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA时,IgG包括IgG4,所述检测板的检测位点上固定有待测过敏原蛋白,所述荧光微球偶联的检测抗体为荧光微球偶联的抗人IgE、IgG或IgA抗体,IgG包括IgG4;所述过敏原蛋白包括螨虫类过敏原、植物花粉类过敏原、霉菌类过敏原、动物皮屑类过敏原、昆虫类过敏原、植物食物类过敏原、动物食物类过敏原和药物类过敏原;

固定有待测过敏原蛋白的检测板的制备方法包括以下步骤:

使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板;将待测过敏原蛋白分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测过敏原蛋白;将生物素标记的待测过敏原蛋白分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测过敏原蛋白的检测板。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述检测板中反应槽的数量为5~20个,每个反应槽的底部设置的检测位点的数量为20~50个。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述生物素进行标记前,将待测细胞因子特异性单抗与0.01M,pH7.4的PBS缓冲液混合进行溶解;待测细胞因子配对抗体与荧光微球偶联前,将待测细胞因子配对抗体与0.01M,pH7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合进行溶解。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述生物素进行标记前,将待测过敏原蛋白与0.1M,pH7.4的PBS缓冲液混合进行溶解;待测过敏原蛋白与荧光微球偶联前,将待测过敏原蛋白与0.01M,pH7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合进行溶解。

一种荧光芯片定量检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白检测技术领域,具体涉及一种高灵敏、荧光芯片定量检测人血清或血浆中多种细胞因子水平和过敏原特异性IgE、IgG和IgA浓度,IgG包括IgG4的试剂盒。

背景技术

[0002] 细胞因子风暴(高细胞因子血症)这一术语首次在1993作为移植物抗宿主病(GVHD)的发病机制被提出。该术语在传染病研究中的使用始于2000年初,在有关巨细胞病毒、噬血细胞性淋巴组织细胞增生症、流感病毒、严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒(SARS-CoV)等报道中被使用。细胞因子风暴是引起急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和多器官衰竭的重要原因,其浓度与疾病的严重程度和预后相关。

[0003] 细胞因子是免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导多种细胞产生的低分子量可溶性蛋白质,具有调节固有免疫和适应性免疫、血细胞生成、细胞生长以及损伤组织修复等多种功能。细胞因子可分为白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、集落刺激因子(CSF)、趋化因子和生长因子等。众多细胞因子在机体内相互促进或相互制约,形成极其复杂的细胞因子免疫调节网络。特定的细胞因子以自分泌、旁分泌或内分泌3种方式发挥生物学作用,具有多效性、重叠性、拮抗性和协同性等多种特性。作为一把“双刃剑”,细胞因子和其他免疫分子一样,既可发挥免疫调节作用,在一定条件下也可参与多种疾病的发生,甚至引发细胞因子风暴及细胞因子风暴综合征,导致多器官损伤、功能衰竭而死亡。

[0004] 细胞因子风暴与多种传染性和非传染性疾病有关,是由感染、药物等多种因素诱发的全身系统性炎症反应。与细胞因子风暴有关的炎症始于局部组织,并通过循环波及全身,具体表现为血流量增加升高局部温度(发热)、肌肉痛/关节痛、恶心、皮疹、精神不振等轻度类似流感的急性炎症症状,动员机体免疫系统抵抗病原体感染。急性炎症反应也以促炎细胞因子或趋化因子释放为特征。炎症开始后不久即开始了补偿性修复过程,在许多情况下,修复过程可以完全恢复组织和器官功能。病原体在感染状态下试图扰乱精密的免疫调节系统以逃避免疫反应,并演化出多种逃避策略以实现大量复制。有些情况下,病原体可以逃脱免疫应答进而不会诱导有效的免疫反应;而在其他情况下,某些病原体能过度地刺激免疫系统,当局部组织结构遭到破坏时,失调的炎性细胞因子/趋化因子可能溢出到循环系统中,引起大规模的炎症级联反应。当风暴来袭时,单器官或多器官系统炎症反应过度表现,如肺部症状(低氧血症、血管渗漏引起的肺水肿,甚至ARDS)、心血管症状(低血压、心律失常、心肌损害、休克)、血液系统症状(血细胞持续降低、凝血障碍、弥漫性血管内凝血)、急性肾损伤、多器官功能衰竭,甚至危及生命。这种不受控制的全身性炎症反应是由初次免疫细胞过度激活和扩增所致的极端炎症反应介质释放所引起。

[0005] 过敏性疾病包括过敏性哮喘、过敏性鼻炎、过敏结膜炎、特应性皮炎、荨麻疹、血管性水肿、严重过敏反应等。过敏性疾病是患者吸入或摄食入含有致敏成分的物质(称为过敏原或变应原,Allergen)后触发机体的B细胞产生过量的免疫球蛋白E(Immunoglobulin E, IgE),当IgE抗体在体内再次接触过敏原时就与过敏原交联结合到肥大细胞和嗜碱性粒

细胞表面上的高亲和受体FcεR1上,导致FcεR1受体的聚集,使肥大细胞和嗜碱性粒细胞活化。肥大细胞在活化过程中脱颗粒并释放储存在细胞浆颗粒里的炎性介质:组胺,与通过花生四烯酸途径合成的白三烯、免疫反应性前列腺素和IL4、IL5等细胞因子及趋化因子,引发过敏反应的疾病症状。过敏性疾病的发生,IgE抗体起关键作用,称为IgE介导的过敏反应(即Gell-Coombs I型超敏反应,或称IgE介导的速发性超敏反应)。IgE介导的过敏性疾病的特征是患者体内循环血液中的过敏原特异性IgE(sIgE)抗体浓度较正常状况下高,且病症越严重,sIgE抗体浓度越高。

[0006] 过敏性疾病的临床诊断在美国临床医师实用指南中指出,根据患者病史结合点刺或血液检测过敏原特异性IgE(sIgE)抗体浓度,筛查致病过敏原(Siles R I,Hsieh F H.Allergy blood testing:A practical guide for clinicians.Am Clin J Medicine.2011;78:585-592.)。目前,检测血液中过敏原特异性IgE(sIgE)抗体浓度,筛查致病过敏原的方法有酶免疫法(EIA)、免疫印迹法(Immunoblotting Assay)、胶体金侧流层析法(LFA)、蛋白芯片法(Proteins microarray)等,符合发展趋势和市场要求的是:自动化、快速、准确、样品用量少,一次筛查几十种过敏原。市场上产品不少,其中,ThermoFisher公司Phadia品牌产品ImmunoCAP 250系统是酶免疫法的代表,ImmunoCAP Rapid是胶体金侧流层析法的代表,ImmunoCAP ISAC是蛋白芯片法的代表,开创了过敏原分子诊断;而德国Mediwiss-analytic公司的AllergyScreen则是免疫印迹法的代表(AlleisaScreen® Immunoblot for analysing specific IgE in human serum)。因人血液中IgE抗体平均浓度~0.005ug/ml,是总免疫球蛋白平均浓度的0.002%,sIgE抗体浓度更低,为满足自动化、快速、准确、样品用量少,一次筛查几十种过敏原,半定量或定量检测样品中的过敏原特异性IgE(sIgE)抗体浓度的要求,必须配置光电信号放大的检测仪,或生物化学方法的信号放大系统。如ImmunoCAP Rapid一次只能筛查十来种过敏原,不配阅读仪,肉眼判读sIgE抗体浓度的灵敏度只有1.0IU/ml(1IU IgE=2.44ng IgE),用1.49IU/ml区分阴性和阳性结果。

[0007] 细胞因子与炎症高度相关,检测细胞因子能尽早进行炎症调控,临床指导抗生素的使用,辅助诊断病毒感染等。目前检测细胞因子的方法有流式荧光和酶联免疫法,流式荧光的成本较高,仪器成本高,酶联免疫法只能单项检测,血清用量较大。而目前市场上测过敏特异性IgE大多是定性,定量的需要较大型的仪器,实验时间长,需要的样本量大。

[0008] 细胞因子,过敏原蛋白特异性IgE、IgG(包括IgG4)、IgA等项目都是指标较多的项目,目前市场上能检测的方法存在仪器较大、检测成本高或者实验时间长、样本量大等问题。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种荧光芯片定量检测试剂盒。本发明所述试剂盒通量较高、反应成本低、准确率高且重复性好,能够高灵敏地检测细胞因子或过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA,IgG包括IgG4。

[0010] 本发明提供了一种荧光芯片定量检测试剂盒,所述试剂盒包括检测板和荧光微球偶联的检测抗体;所述检测板设有多个反应槽,反应槽设有开口,所述反应槽的内底面沿所述反应槽的长度方向并排间隔设置有多个检测位点。

[0011] 优选的是,所述检测板的材质包括聚苯乙烯;所述反应槽的上端设有开口,所述反

应槽的内底面上沿所述反应槽的长度方向并排间隔设置有多个检测位点;所述检测位点为凹槽或凸起柱。

[0012] 优选的是,所述检测板中反应槽的数量为5~20个,每个反应槽的底部设置的检测位点的数量为20~50个。

[0013] 优选的是,所述试剂盒的待测物包括细胞因子或过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA,IgG包括IgG4。

[0014] 优选的是,当所述试剂盒的待测物为细胞因子时,所述检测板的检测位点上固定有待测细胞因子特异性单抗,所述荧光微球偶联的检测抗体为荧光微球偶联的待测细胞因子配对抗体;所述待测细胞因子包括IL-1beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12P70、IL-17A、TNF-a、IFN- γ 和IFN- α 。

[0015] 优选的是,固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板的制备方法包括以下步骤:

[0016] 使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板;将待测细胞因子特异性单抗分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测细胞因子特异性单抗;将生物素标记的待测细胞因子特异性单抗分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板。

[0017] 优选的是,所述生物素进行标记前,将待测细胞因子特异性单抗与0.01M,pH 7.4的PBS缓冲液混合进行溶解;待测细胞因子配对抗体与荧光微球偶联前,将待测细胞因子配对抗体与0.01M,pH 7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween 20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合进行溶解。

[0018] 优选的是,当所述试剂盒的待测物为过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA时,IgG包括IgG4,所述检测板的检测位点上固定有待测过敏原蛋白,所述荧光微球偶联的检测抗体为荧光微球偶联的抗人IgE、IgG或IgA抗体,IgG包括IgG4;所述过敏原蛋白包括螨虫类过敏原、植物花粉类过敏原、霉菌类过敏原、动物皮屑类过敏原、昆虫类过敏原、植物食物类过敏原、动物食物类过敏原和药物类过敏原。

[0019] 优选的是,固定有待测过敏原蛋白的检测板的制备方法包括以下步骤:

[0020] 使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板;将待测过敏原蛋白分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测过敏原蛋白;将生物素标记的待测过敏原蛋白分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测过敏原蛋白的检测板。

[0021] 优选的是,所述生物素进行标记前,将待测过敏原蛋白与0.1M,pH 7.4的PBS缓冲液混合进行溶解;待测过敏原蛋白与荧光微球偶联前,将待测过敏原蛋白与0.01M,pH 7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween 20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合进行溶解。

[0022] 本发明提供了一种荧光芯片定量检测试剂盒。本发明使用荧光微球方法加生物素-链霉亲和素生物方法的双重信号放大系统高灵敏地检测过敏原特异性IgE(sIgE)、IgG(包括IgG4)和IgA,本发明能够快速定量检测人血清或血浆中的过敏原特异性抗体IgE、IgG(IgG4)和IgA浓度,并可一次筛查几十种过敏原;本发明所述试剂盒还可高灵敏地定量地快速检测人血清或血浆中的细胞因子浓度,并可一次筛查十几种细胞因子,快速、准确、灵敏度高,适宜进行高通量检测。

附图说明

- [0023] 图1为本发明提供的反应槽的结构示意图；
[0024] 图2为本发明提供的反应槽外底面的结构示意图；
[0025] 图3为本发明提供的检测板的结构示意图；
[0026] 图4为本发明提供的检测板中固定架的结构示意图；
[0027] 图5为本发明提供的检测板中固定架的背部结构示意图。

具体实施方式

[0028] 本发明提供了一种荧光芯片定量检测试剂盒，所述试剂盒包括检测板和荧光微球偶联的检测抗体；所述检测板设有多个反应槽，反应槽设有开口，所述反应槽的内底面沿所述反应槽的长度方向并排间隔设有多个检测位点。本发明所述试剂盒使用荧光微球放大信号，结合检测板（生物素-链霉亲和素生物方法）的使用，得到双重信号放大系统，既能同时检测多个指标，又能通过荧光定量，极大提高检测效率和检测灵敏度。在本发明中，所述检测板和荧光微球偶联的检测抗体分别放置。

[0029] 在本发明中，所述检测板的材质优选包括聚苯乙烯；所述反应槽的上端设有开口，所述反应槽的内底面上沿所述反应槽的长度方向并排间隔设有多个检测位点；所述检测位点优选为凹槽或凸起柱。

[0030] 在本发明中，所述反应槽优选为透明材质。

[0031] 在本发明中，所述反应槽的外底面上至少在与多个所述检测位点对应的部位处向内凹陷。

[0032] 在本发明中，所述反应槽上优选沿其长度方向的两端侧壁上分别固定设置有第一手柄和第二手柄，所述第一手柄和所述第二手柄用于嵌装在固定架上以使所述反应槽固定在固定架上，固定后得到本发明检测板。在本发明中，所述固定架优选为上端开口的槽体，若干所述反应槽沿其宽度方向并排固定设置在所述槽体内。

[0033] 在本发明中，所述第一手柄的外形与所述第二手柄的外形优选不同。

[0034] 在本发明中，所述反应槽上沿其长度方向的两端侧壁上优选分别固定设置有第一手柄和第二手柄，所述固定架上相对的两个侧壁的上端面上沿所述反应槽的宽度方向分别设置有若干个第一手柄嵌入槽和若干个第二手柄嵌入槽，所述第一手柄嵌入槽的外形与所述第一手柄的外形相匹配，所述第二手柄嵌入槽的外形与所述第二手柄的外形相匹配，所述反应槽与所述固定架通过所述第一手柄和所述第二手柄分别嵌装在所述第一手柄嵌入槽和所述第二手柄嵌入槽内实现固定连接。在本发明中，所述槽体的下底面上优选设有多个减重孔，所述固定架侧壁的下端面上优选设有减重槽。

[0035] 在本发明中，所述检测板的结构优选如图1~5所示，图1为反应槽的结构示意图；图2为反应槽外底面的结构示意图；图3为检测板的结构示意图；图4为检测板中固定架的结构示意图；图5为检测板中固定架的背部结构示意图；图中：1-反应槽，2-反应部，3-防滑凹槽，4-第一手柄，5-第二手柄，6-固定架，7-第一手柄嵌入槽，8-第二手柄嵌入槽，9-减重孔，10-减重槽。

[0036] 在本发明中，所述反应槽的上端开口，所述反应槽的内底面上沿所述反应槽的长度方向并排间隔设有多个检测位点，所述检测位点能够承载蛋白或抗体，且蛋白或抗体

能够吸附在所述检测位点上。本发明对多个检测位点之间的间距没有特殊限定。

[0037] 在本发明中,所述试剂盒优选还包括稀释液和洗涤液。在本发明中,所述稀释液优选为PBS缓冲液。在本发明中,所述洗涤液优选为0.01M,pH7.4的含质量百分含量为0.05% Tween 20的PBS缓冲液。

[0038] 在本发明中,所述试剂盒的待测物包括细胞因子或过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA,IgG包括IgG4。

[0039] 在本发明中,当所述试剂盒的待测物为细胞因子时,所述检测板的检测位点上固定有待测细胞因子特异性单抗,所述荧光微球偶联的检测抗体为荧光微球偶联的待测细胞因子配对抗体;所述待测细胞因子包括IL-1beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12P70、IL-17A、TNF- α 、IFN- γ 和IFN- α 。

[0040] 本发明对所述待测细胞因子特异性单抗的来源没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规市售产品即可。如Anti-IL-1beta Antibody (SinoBiological,10139-MM07); IL-2 (abcam,ab222639);Anti-IL-4Antibody (SinoBiological,11846-MM04);Anti-IL-5Antibody (SinoBiological,15673-R001);Anti-IL-6Antibody (SinoBiological,10395-MM14);Anti-IL-8Antibody (SinoBiological,10098-MM05);Anti-IL-10Antibody (SinoBiological,10947-MM19);Anti-IL-12p70 Antibody (SinoBiological,CT011-R001);Anti-IL17 Antibody (SinoBiological,12047-MM25);Anti-TNF- α Antibody (SinoBiological,10602-MM01);Anti-IFN- γ Antibody (SinoBiological,11725-R209);Anti IFN- α Antibody (ProSpec-Tany,ANT-208)。

[0041] 本发明对所述待测细胞因子配对抗体的来源也没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规市售产品即可。如Anti-IL-1beta Antibody (SinoBiological,10139-MM097);IL-2 (abcam,ab222640);Anti-IL-4Antibody (SinoBiological,11846-MM05);Anti-IL-5Antibody (SinoBiological,15673-R013);Anti-IL-6Antibody (SinoBiological,10395-MM72);Anti-IL-8Antibody (SinoBiological,10098-MM18);Anti-IL-10Antibody (SinoBiological,10947-T16);Anti-IL-12p70Antibody (SinoBiological,CT011-R070);Anti-IL17 Antibody (SinoBiological,12047-MM31);TNF alpha (SinoBiological,10602-MM08);IFN- γ (SinoBiological,11725-R238);Anti IFN- α Antibody (ProSpec-Tany,ANT-208)。

[0042] 在本发明中,固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板的制备方法包括以下步骤:

[0043] 使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板;将待测细胞因子特异性单抗分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测细胞因子特异性单抗;将生物素标记的待测细胞因子特异性单抗分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板。

[0044] 本发明使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板。本发明对所述包被的方法没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规链霉亲和素包被方法即可。

[0045] 本发明将待测细胞因子特异性单抗分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测细胞因子特异性单抗。在本发明中,所述生物素进行标记前,优选将待测细胞因子特异

性单抗与0.01M,pH 7.4的PBS缓冲液混合进行溶解。在本发明中,所述待测细胞因子特异性单抗与0.01M,pH 7.4的PBS缓冲液混合的体积比优选为1:(1~10),更优选为1:10,达到最佳的灵敏度和特异性。

[0046] 本发明将生物素标记的待测细胞因子特异性单抗分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板。即本发明需在检测板反应槽中的不同位点固化不同的待测细胞因子单克隆抗体。在本发明中,待测细胞因子配对抗体与荧光微球偶联前,优选将待测细胞因子配对抗体与0.01M,pH 7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween 20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合进行溶解,达到最佳的灵敏度和特异性。在本发明中,所述待测细胞因子配对抗体与0.01M,pH 7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween 20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合的体积比优选为1:(10~1000),更优选为1:100,达到最佳的灵敏度和特异性。在本发明中,所述荧光微球优选购自invitrogen,型号F8807。

[0047] 在本发明中,利用所述试剂盒高通量检测细胞因子的方法优选包括以下步骤:

[0048] (1) 将固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板水平固定,室温放置;

[0049] (2) 将待测血清或血浆加入检测板的反应槽中,混匀,室温孵育30~60min;

[0050] (3) 用洗涤液冲洗反应槽;

[0051] (4) 将荧光微球偶联的待测细胞因子配对抗体加入反应槽中,混匀、室温孵育30~60min;

[0052] (5) 用洗涤液冲洗反应槽;

[0053] (6) 干燥,用阅读仪进行判读。

[0054] 本发明将固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板水平固定,室温(18~26℃)放置。在本发明中,所述水平固定优选为将固定有待测细胞因子特异性单抗的检测板放到固定用板架里。

[0055] 本发明将待测血清或血浆加入检测板的反应槽中,混匀,室温(18~26℃)孵育30~60min。本发明所述混匀优选使用混匀器进行操作,所述混匀器优选包括摇床。本发明所述摇床优选购自沃德生物医学仪器公司,为WD-9405A型脱色摇床。

[0056] 孵育后,本发明用洗涤液冲洗反应槽。在本发明中,所述冲洗的次数优选为3~5次,每次优选冲洗10~30s。本发明对冲洗时,洗涤液加入反应槽的量没有特殊限定,采用常规洗涤液用量即可,如加至覆盖所有的检测位点但在反应过程中不会溢出。

[0057] 冲洗后,本发明将荧光微球偶联的待测细胞因子配对抗体加入反应槽中,混匀、室温(18~26℃)孵育30~60min。

[0058] 孵育后,本发明用洗涤液冲洗反应槽。在本发明中,所述冲洗的次数优选为3~5次,每次优选冲洗10~30s。本发明对冲洗时,洗涤液加入反应槽的量没有特殊限定,采用常规洗涤液用量即可,如加至覆盖所有的检测位点但在反应过程中不会溢出。

[0059] 冲洗后,本发明对所述检测板进行干燥,用阅读仪进行判读。在本发明中,所述干燥的方式优选包括用手在纸巾上拍干。本发明所述阅读仪优选为带数据处理功能的阅读仪,可定量地检测人血清或血浆中的多个细胞因子浓度。在本发明中,所述阅读仪优选购自天津派普大业公司,荧光免疫分析仪,型号:F10Pro。本发明所述阅读仪能读出对应位置的

荧光值,再根据标准曲线计算得到浓度。

[0060] 本发明试剂盒可高灵敏地定量地快速检测人血清或血浆中的细胞因子浓度,并可一次筛查数十种细胞因子,快速、准确、灵敏度高,适宜进行高通量检测。

[0061] 在本发明中,当所述试剂盒的待测物为过敏原蛋白特异性IgE、IgG和IgA时,IgG包括IgG4,所述检测板的检测位点上固定有待测过敏原蛋白,所述荧光微球偶联的检测抗体为荧光微球偶联的抗人IgE、IgG或IgA抗体,IgG包括IgG4;所述过敏原蛋白包括螨虫类过敏原、植物花粉类过敏原、霉菌类过敏原、动物皮屑类过敏原、昆虫类过敏原、植物食物类过敏原、动物食物类过敏原和药物类过敏原。本发明所述过敏原蛋白可按常规方法从天然原材料中提取或通过基因工程重组表达。在本发明中,所述螨虫类过敏原优选包括尘螨类、仓储螨类及热带螨类,所述植物花粉类过敏原优选包括树花粉类、草花粉类及野草花粉类等;所述植物食物类过敏原优选包括水果类、蔬菜类、坚果类、食用菌类及谷物类;所述动物食物类过敏原优选包括肉类、禽蛋类、鱼、甲壳类及奶类等。

[0062] 在本发明中,固定有待测过敏原蛋白的检测板的制备方法包括以下步骤:

[0063] 使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板;将待测过敏原蛋白分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测过敏原蛋白;将生物素标记的待测过敏原蛋白分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测过敏原蛋白的检测板。

[0064] 本发明使用链霉亲和素对检测板的每个检测位点进行包被,得到包被后的检测板。本发明对所述包被的方法没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规链霉亲和素包被方法即可。

[0065] 本发明将待测过敏原蛋白分别使用生物素进行标记,得到生物素标记的待测过敏原蛋白。在本发明中,所述生物素进行标记前,优选将待测过敏原蛋白与0.1M,pH 7.4的PBS缓冲液混合进行溶解。本发明优选使用0.1M,pH 7.4的PBS将过敏原蛋白配制成适合的浓度,如:植物花粉类过敏原蛋白:0.1~5.0mg/ml;霉菌类过敏原蛋白:1.0~5.0mg/ml;动物皮屑类过敏原蛋白:0.5~5.0mg/ml;植物食物类过敏原蛋白:1.0~7.0mg/ml;动物食物类过敏原蛋白:1.0~8.0mg/ml;昆虫类过敏原蛋白:1~5.0mg/ml等,使最终检测达到最佳的分析性能和临床性能。

[0066] 本发明将生物素标记的待测过敏原蛋白分别偶联在检测板的不同的检测位点上,得到固定有待测过敏原蛋白的检测板。即本发明需在检测板反应槽中的不同位点固化不同的待测过敏原蛋白。本发明优选取生物素标记的待测过敏原蛋白0.5~2 μ L在检测位点上,37 $^{\circ}$ C下反应30min,实现固化。

[0067] 在本发明中,待测过敏原蛋白与荧光微球偶联前,优选将待测过敏原蛋白与0.01M,pH 7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween 20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合进行溶解。在本发明中,所述待测过敏原蛋白与0.01M,pH 7.4的含质量百分含量为0.05%的Tween 20、质量百分含量为0.05%的Proclin-300和质量百分含量为0.1%的BSA的PBS缓冲液混合的体积比优选为1:(100~10000),更优选为1:1000。在本发明中,所述荧光微球优选购自abcam,荧光微球型号为abcam-ab7295。

[0068] 在本发明中,利用所述试剂盒高通量检测过敏原特异性IgE(sIgE)、IgG(包括

IgG4) 或IgA的方法优选包括以下步骤:

[0069] (1) 将固定有不同过敏原蛋白的检测板水平固定, 室温放置;

[0070] (2) 将待测血清或血浆加入检测板的反应槽中, 混匀, 室温孵育30~60min;

[0071] (3) 用洗涤液冲洗反应槽;

[0072] (4) 将荧光微球偶联的待测抗人IgE、IgG (包括IgG4) 或IgA抗体加入反应槽中, 混匀、室温孵育30~60min;

[0073] (5) 用洗涤液冲洗反应槽;

[0074] (6) 干燥, 用阅读仪进行判读。

[0075] 本发明将固定有不同过敏原蛋白的检测板水平固定, 室温 (18~26℃) 放置。在本发明中, 所述水平固定优选为将固定有不同过敏原蛋白的检测板放到固定用板架里。

[0076] 本发明将待测血清或血浆加入检测板的反应槽中, 混匀, 室温 (18~26℃) 孵育30~60min。本发明所述混匀优选使用混匀器进行操作, 所述混匀器优选包括摇床。本发明所述摇床优选购自沃德生物医学仪器公司, 为WD-9405A型脱色摇床。

[0077] 孵育后, 本发明用洗涤液冲洗反应槽。在本发明中, 所述冲洗的次数优选为3~5次, 每次优选冲洗10~30s。本发明对冲洗时, 洗涤液加入反应槽的量没有特殊限定, 采用常规洗涤液用量即可, 如加至覆盖所有的检测位点但在反应过程中不会溢出。

[0078] 冲洗后, 本发明将荧光微球偶联的待测抗人IgE、IgG (包括IgG4) 或IgA抗体加入反应槽中, 混匀、室温 (18~26℃) 孵育30~60min。

[0079] 孵育后, 本发明用洗涤液冲洗反应槽。在本发明中, 所述冲洗的次数优选为3~5次, 每次优选冲洗10~30s。本发明对冲洗时, 洗涤液加入反应槽的量没有特殊限定, 采用常规洗涤液用量即可, 如加至覆盖所有的检测位点但在反应过程中不会溢出。

[0080] 冲洗后, 本发明对所述检测板进行干燥, 用阅读仪进行判读。在本发明中, 所述干燥的方式优选包括用手在纸巾上拍干。本发明所述阅读仪优选为带数据处理功能的阅读仪, 可定量地检测人血清或血浆中的多个过敏原特异性抗体IgE、IgG (包括IgG4) 或IgA浓度。在本发明中, 所述阅读仪优选购自天津派普大业公司, 荧光免疫分析仪, 型号:F10Pro。本发明所述阅读仪能读出对应位置的荧光值, 再根据标准曲线计算得到浓度。

[0081] 本发明试剂盒可高灵敏地定量地快速检测人血清或血浆中的过敏原特异性IgE (sIgE)、IgG (包括IgG4) 或IgA浓度, 并可一次筛查数十种过敏原, 快速、准确、灵敏度高, 成本低, 仪器便携, 适宜进行高通量检测。

[0082] 下面结合具体实施例对本发明所述的一种荧光芯片定量检测试剂盒做进一步详细的介绍, 本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

[0083] 实施例1

[0084] 本发明的试剂盒的制备

[0085] 1. 聚苯乙烯检测板固化细胞因子特异性单克隆抗体

[0086] A. 将市购的链霉亲和素用0.01M, pH 7.4的PBS配制成适合的浓度 (如: 0.1~2mg/mL), 加0.5~2uL在检测板的反应槽各个检测位点上, 4℃下静置反应过夜 (16h以上);

[0087] B. 加0.5~1.5mL, 0.01M, pH7.4的含0.05% Tween 20的PBS清洗检测板的反应槽1次后拍干。

[0088] C. 每条反应槽加0.5~1.5mL, 0.01M, pH7.4的含2% BSA的PBS封闭, 4℃下静置反应

过夜(16h以上);

[0089] D.加0.5~1.5mL,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。

[0090] E.将生物素标记的细胞因子单克隆抗体用0.01M,pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:IL-1beta:0.1~7.0mg/mL;IL-2:2.0~5.0mg/mL;IL-4:0.05~3.0mg/mL;IL-5:1.0~8.0mg/mL;IL-6:1.5~10.0mg/mL;IL-8:0.1~3.0mg/mL;IL-10:2.0~5.0mg/mL;IL-12P70:1.5~10.0mg/mL;IL-17A:1.0~8.0mg/mL;TNFa:2.0~5.0mg/mL;IFN- γ :1.5~10.0mg/mL)加0.5~2uL在相应位置的小孔中,37°C下反应30min;

[0091] F.加0.5~1.5mL,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板3次后拍干,备用。

[0092] 2. 荧光微球偶联的细胞因子混合抗体

[0093] (1) IL-1beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12P70、IL-17A、TNF-a、IFN- γ 、IFN- α 单克隆抗体按比例混合(如:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1),浓度都用PBS配制成1mg/ml。

[0094] (2) 微球偶联

[0095] A.向1个2mL离心管中依次加入835uL纯化水,加入50uL偶联缓冲液(pH6.1的500mM MES(2-(N-吗啉)乙磺酸)溶液)混合均匀;

[0096] B.加入100uL 200nm荧光微球(invitrogen,F8807)(固含2%)并混合均匀;

[0097] C.向离心管中加入50ug步骤(1)混合后的单克隆抗体溶液并混合均匀,然后置于旋转反应器上室温下旋转混合30min(温和并持续的旋转);

[0098] D.反应结束后,配制10mg/mL的EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)水溶液(现配现用,标记时用于活化羧基),并立刻向离心管中转移5uLEDC溶液,通过移液枪吹打快速混匀;

[0099] E.通过涡流混匀充分混合,置于旋转混合器上室温混合反应2h;

[0100] F.反应完成后,通过离心分离(15000rpm,8min)除去上清液,向离心管中加入1mL洗涤缓冲液(0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS),通过超声混匀(15%功率,脉冲3s停3s1min)使反应产物重新完全分散;

[0101] G.重复洗涤反应产物2次:通过离心分离(15000rpm,10min)除去上清液,加入1mL洗涤缓冲液,通过超声混匀(10%功率,脉冲3s停3s1min)使反应产物重新完全分散;

[0102] H.而后向其中加入1mL封闭缓冲液(0.01M,pH7.4的含0.05%Tween20、0.5%BSA的PBS),通过超声混匀重新分散后置于旋转混匀器上室温下反应1h;

[0103] I.反应完成后,通过离心分离(15000rpm,6min)除去上清液,用1mL保存缓冲液(0.01M,pH7.4的含0.05%Tween20、0.05%Proclin-300、0.1%BSA的PBS)洗涤反应产物两次,最终将反应产物保存在2mL的保存缓冲液中。

[0104] 实施例2

[0105] 使用荧光方法加生物方法(生物素-链霉亲和素法)的双重信号放大系统

[0106] 检测试剂盒准备参见实施例1

[0107] 检测方法如下:

[0108] (1)取固化有不同细胞因子单克隆抗体的检测板,室温下水平放置在特制板架上,备用;

- [0109] (2) 将200~400 μ L血清或血浆加入各反应槽中,将板架置于混匀器上,室温孵育30~60min;
- [0110] (3) 用洗涤液冲洗液反应槽,重复清洗3~5次,每次10~30s;
- [0111] (4) 将200~400 μ L荧光微球偶联的混合配对抗体工作液用PBS 1:10~1000(体积比)稀释后加入各反应槽中,置于混匀器上室温孵育30~60min;
- [0112] (5) 用洗涤液冲洗液反应槽,重复清洗3~5次,每次10~30s;
- [0113] (6) 拍干检测板,用阅读仪进行判读,检测荧光值,再根据标准曲线计算得到浓度。结果见表1。
- [0114] 实施例3
- [0115] 常规的ELISA双抗夹心法(未使用本发明的荧光方法加生物方法)的双重信号放大系统:
- [0116] 检测方法如下:
- [0117] (1) 将细胞因子单克隆抗体用0.01M, pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:IL-1beta:0.1~7.0mg/mL; IL-2:2.0~5.0mg/mL; IL-4:0.05~3.0mg/mL; IL-5:1.0~8.0mg/mL; IL-6:1.5~10.0mg/mL; IL-8:0.1~3.0mg/mL; IL-10:2.0~5.0mg/mL; IL-12P70:1.5~10.0mg/mL; IL-17A:1.0~8.0mg/mL; TNF-a:2.0~5.0mg/mL; IFN- γ :1.5~10.0mg/mL; IFN- α :1.5~10.0mg/mL等)加50 μ L在酶标板相应位置的孔里,4 $^{\circ}$ C下静置反应过夜(16h以上);
- [0118] (2) 加150 μ L/孔,0.01M, pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗酶标板1次后拍干。
- [0119] (3) 加100 μ L/孔,0.01M, pH7.4的含2%BSA的PBS封闭,4 $^{\circ}$ C下静置反应过夜(16h以上);
- [0120] (4) 加150 μ L/孔,0.01M, pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗酶标板1次后拍干,备用。
- [0121] (5) 取包被有不同细胞因子单克隆抗体的酶标板,室温下水平放置在摇床上,备用;
- [0122] (6) 将20~100 μ L血清或血浆加入酶标板中,将酶标板置于摇床上,室温孵育30~60min;
- [0123] (7) 用洗涤液冲洗液酶标板各孔,重复清洗3~5次,每次10~30s;
- [0124] (8) 将20~100 μ L HRP偶联的混合配对抗体工作液(IL-1beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12P70、IL-17A、TNF-a、IFN- γ 、IFN- α 单克隆抗体按一定比例混合(如:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1),浓度与实施例1一样)用PBS 1:(10~1000)(体积比)稀释后加入酶标板中,置于混匀器上室温孵育30~60min;
- [0125] (9) 用洗涤液冲洗液反应槽,重复清洗3~5次,每次10~30s,拍干;
- [0126] (10) 加入TMB显色液20~100 μ L,置于混匀器上室温孵育5~15min;
- [0127] (11) 用酶标仪进行判读。
- [0128] 表1血清样本中的过细胞因子水平两种系统检测结果的比较

项目	IL-1beta	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12P7 0	IL-17 A	TNF-a	IFN- γ	IFN- α
[0129] 实施 例 2	60pg/mL	100pg/ mL	10pg/ mL	10pg/m L	6pg/m L	10pg/ mL	50pg/m L	5pg/mL	10pg/ mL	100pg/ mL	10pg/ mL	12pg/ mL
实施 例 3	检测不 到	105pg/ mL	10pg/ mL	12pg/m L	检测 不到	13pg/ mL	55pg/m L	检测不 到	11pg/ mL	112pg/ mL	检测 不到	检测 不到

[0130] 比较表1的检测结果可见,由于实施例3未使用链霉亲和素-生物素和荧光微球的双重信号放大系统,检测灵敏度较低,使得低浓度的细胞因子未检出。

[0131] 以上结果表明,利用本发明试剂盒进行检测,信号被双重放大,可以使检测灵敏度更高,而且可以同时检测多个指标,操作简便。

[0132] 实施例4

[0133] 本发明的检测试剂制备

[0134] 1. 检测板固化过敏原蛋白

[0135] A. 将市购的链霉亲和素用0.01M, pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:0.1~2mg/mL),加0.5-2uL在检测板的反应槽中的小孔里,4℃下静置反应过夜(16小时以上);

[0136] B. 加0.5-1.5mL,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。

[0137] C. 每条检测板的反应槽加0.5-1.5mL,0.01M,pH7.4的含2%BSA的PBS封闭,4℃下静置反应过夜(16小时以上);

[0138] D. 加0.5-1.5mL,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。

[0139] E. 将生物素标记的过敏原蛋白用0.1mol/L,pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:植物花粉类过敏原蛋白:0.1~5.0mg/ml;霉菌类过敏原蛋白:1.0~5.0mg/ml;动物皮屑类过敏原蛋白:0.5~5.0mg/ml;植物食物类过敏原蛋白:1.0~7.0mg/ml;动物食物类过敏原蛋白:1.0~8.0mg/ml;昆虫类过敏原蛋白:1~5.0mg/ml等)加0.5-2uL在相应位置的小孔中,37℃下反应30min;

[0140] F. 加0.5-1.5mL,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板3次后拍干,备用。

[0141] 2. 荧光微球偶联抗人IgE抗体

[0142] A. 向1个2mL离心管中依次加入835uL纯化水,加入50uL偶联缓冲液(pH6.1的500mM MES(2-(N-吗啉)乙磺酸)溶液)混合均匀;

[0143] B. 加入100uL 100-500nm荧光微球(固含2%)(invitrogen,F8807)并混合均匀;

[0144] C. 向离心管中加入50ug抗体溶液并混合均匀,然后置于旋转反应器上室温下旋转混合30min(温和并持续的旋转);

[0145] D. 反应结束后,配制5-20mg/mL的EDC水溶液(现配现用)(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,标记时起活化羧基的作用),并立刻向离心管中转移1-10uLEDC溶液,通过移液枪吹打快速混匀;

[0146] E. 通过漩涡混匀充分混合,置于旋转混合器上室温混合反应2h;

[0147] F. 反应完成后,通过离心分离(15000rpm,8min)除去上清液,向离心管中加入1mL洗涤缓冲液(0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS),通过超声混匀(15%功率,脉冲3秒

停3秒1min)使反应产物重新完全分散;

[0148] G.重复洗涤反应产物2次:通过离心分离(15000rpm,10min)除去上清液,加入1mL洗涤缓冲液,通过超声混匀(10%功率,脉冲3秒停3秒1min)使反应产物重新完全分散;

[0149] H.而后向其中加入1mL封闭缓冲液(0.01M,pH7.4的含0.05%Tween20、0.5%BSA的PBS),通过超声混匀重新分散后置于旋转混匀器上室温下反应1h;

[0150] I.反应完成后,通过离心分离(15000rpm,6min)除去上清液,用1mL保存缓冲液(0.01M,pH7.4的含0.05%Tween20、0.05%Proclin-300、0.1%BSA的PBS)洗涤反应产物两次,最终将反应产物保存在2mL的保存缓冲液中。

[0151] 实施例5

[0152] 使用荧光方法加生物方法(生物素-链霉亲和素法)的双重信号放大系统:

[0153] 检测试剂配制参见实施例4

[0154] 检测方法如下:

[0155] (1)取固化有不同过敏原蛋白的检测板,室温下水平放置在特制板架上,备用;

[0156] (2)将200~400μL血清或血浆分别加入检测板的每个反应槽中,将板架置于摇床上,室温孵育30~60分钟;

[0157] (3)用洗涤液冲洗反应槽,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0158] (4)将200~400μL荧光微球偶联的抗人IgE抗体用PBS 1:10~1000稀释后分别加入检测板的每个反应槽中,置于摇床上室温孵育30~60分钟;

[0159] (5)用洗涤液冲洗检测板,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0160] (6)拍干检测板,用阅读仪读出对应位置的荧光值,再根据标准曲线计算得到浓度值。结果见表2。

[0161] 实施例6

[0162] 未使用荧光方法加生物方法的双重信号放大系统:

[0163] 检测方法如下:

[0164] (1)将过敏原用0.01M,pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:植物花粉类过敏原蛋白:0.1~5.0mg/ml;霉菌类过敏原蛋白:1.0~5.0mg/ml;动物皮屑类过敏原蛋白:0.5~5.0mg/ml;植物食物类过敏原蛋白:1.0~7.0mg/ml;动物食物类过敏原蛋白:1.0~8.0mg/ml;昆虫类过敏原蛋白:1~5.0mg/ml等)加50-100uL在酶标板相应位置的孔里,4℃下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);

[0165] (2)加150uL/孔,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。

[0166] (3)加100uL/孔,0.01M,pH7.4的含2%BSA的PBS封闭,4℃下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);

[0167] (4)加150uL/孔,0.01M,pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干,备用。

[0168] (5)取包被有不同过敏原蛋白的酶标板,室温下水平放置在板架上,备用;

[0169] (6)将20~100μL血清或血浆加入酶标板中,将板架置于摇床上,室温孵育30~60分钟;

[0170] (7)用洗涤液洗板,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0171] (8)将20~100μLHRP偶联的抗人IgE抗体工作液加入酶标板中,置于摇床上室温孵

育30~60分钟；

[0172] (9) 用洗涤液洗板,重复清洗3~5次,每次10~30秒,拍干；

[0173] (10) 每孔加入TMB显色液20~100 μ L,置于摇床上室温孵育5~15分钟；

[0174] (11) 用酶标仪进行判读。

[0175] 表2血清样本中的过敏原特异性IgE抗体水平两种系统检测结果的比较

患者		A			B			C			
检测 结果 (级 别)	过敏原	屋尘 螨	屋尘	牛奶	分枝 孢霉	烟曲 霉	链格 孢霉	矮豚 草	艾蒿	苹果	
	[0176]	实施例5	4	2	2	1	1	2	3	2	1
		实施例6	3	0	1	0	0	0	2	1	0

[0177] 比较上表的检测结果可见,由于实施例6未使用荧光方法加生物化学方法的双重信号放大系统,检测灵敏度较低,使得2级以下(包括某些2级)的sIgE抗体浓度未检出(过敏原sIgE检测半定量结果是采用分级的形式表示,按照国际分级标准分为0-6级,0级为阴性,1-6级为阳性,浓度越高则级别越高)。

[0178] 国际上特异性IgE抗体浓度和定级标准的关系如表3所示：

[0179] 表3国际上特异性IgE抗体浓度和定级标准

国际特异性 IgE 浓度 (IU/ml)	国际定级标准
<0.35	0 (阴性)
0.35-0.70	1 (弱阳性)
[0180] 0.71-3.50	2 (阳性)
3.51-17.50	3 (较强阳性)
17.51-50.0	4 (强阳性)
50.01-100.0	5 (特强阳性)
>100.0	6 (极强阳性)

[0181] 实施例7

[0182] 使用荧光方法加生物方法(生物素-链霉亲和素法)的双重信号放大系统：

[0183] 检测试剂配制参见实施例4

[0184] 检测方法如下：

[0185] (1) 取固化有不同过敏原蛋白的检测板,室温下水平放置在特制板架上,备用；

[0186] (2) 在反应槽中加入300 μ L含2%BSA的PBS,再将20~100 μ L血清或血浆分别加入检测板的每个反应槽中,将板架置于摇床上,室温孵育30~60分钟；

[0187] (3) 用洗涤液冲洗反应槽,重复清洗3~5次,每次10~30秒；

[0188] (4) 将200~400 μ L荧光微球偶联的抗人IgG抗体用PBS 1:(10~1000)稀释后分别加入检测板的每个反应槽中,置于摇床上室温孵育30~60分钟；

[0189] (5) 用洗涤液冲洗检测板,重复清洗3~5次,每次10~30秒；

[0190] (6) 拍干检测板,用阅读仪读出对应位置的荧光值,再根据标准曲线计算得到浓度值。结果见表4。

[0191] 实施例8

[0192] 未使用荧光方法加生物方法的双重信号放大系统:

[0193] 检测方法如下:

[0194] (1) 将过敏原用0.01M, pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:植物花粉类过敏原蛋白:0.1~5.0mg/ml;霉菌类过敏原蛋白:1.0~5.0mg/ml;动物皮屑类过敏原蛋白:0.5~5.0mg/ml;植物食物类过敏原蛋白:1.0~7.0mg/ml;动物食物类过敏原蛋白:1.0~8.0mg/ml;昆虫类过敏原蛋白:1~5.0mg/ml等)加50-100uL在酶标板相应位置的孔里,4℃下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);

[0195] (2) 加150uL/孔,0.01M, pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。

[0196] (3) 加100uL/孔,0.01M, pH7.4的含2%BSA的PBS封闭,4℃下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);

[0197] (4) 加150uL/孔,0.01M, pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干,备用。

[0198] (5) 取包被有不同过敏原蛋白的酶标板,室温下水平放置在板架上,备用;

[0199] (6) 将20~100μL血清或血浆加入酶标板中,将板架置于摇床上,室温孵育30~60分钟;

[0200] (7) 用洗涤液洗板,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0201] (8) 将20~100μL HRP偶联的抗人IgG抗体工作液加入酶标板中,置于摇床上室温孵育30~60分钟;

[0202] (9) 用洗涤液洗板,重复清洗3~5次,每次10~30秒,拍干;

[0203] (10) 每孔加入TMB显色液20~100μL,置于摇床上室温孵育5~15分钟;

[0204] (11) 用酶标仪进行判读。

[0205] 表4血清样本中的过敏原特异性IgG抗体水平检测结果

患者		A			B			C			
检测 结 果	过敏原	鸡蛋 白	牛奶	小麦	鳕鱼	花生	大豆	蟹	虾	贝	
	[0206]	实施例7	2	1	2	1	3	2	4	2	1
[0207]	果	实施例8	1	0	0	0	2	1	2	0	0

[0208] 比较上表的检测结果可见,由于实施例8未使用荧光方法加生物化学方法的双重信号放大系统,检测灵敏度较低,使得2级以下(包括某些2级)的sIgG抗体浓度未检出。

[0209] 实施例9

[0210] 使用荧光方法加生物方法(生物素-链霉亲和素法)的双重信号放大系统:

[0211] 检测试剂配制参见实施例4

[0212] 检测方法如下:

- [0213] (1) 取固化有不同过敏原蛋白的检测板, 室温下水平放置在特制板架上, 备用;
- [0214] (2) 在反应槽中加入300uL含2%BSA的PBS, 再将20~100μL血清或血浆分别加入检测板的每个反应槽中, 将板架置于摇床上, 室温孵育30~60分钟;
- [0215] (3) 用洗涤液冲洗反应槽, 重复清洗3~5次, 每次10~30秒;
- [0216] (4) 将200~400μL荧光微球偶联的抗人IgG4抗体用PBS 1:10~1000稀释后分别加入检测板的每个反应槽中, 置于摇床上室温孵育30~60分钟;
- [0217] (5) 用洗涤液冲洗检测板, 重复清洗3~5次, 每次10~30秒;
- [0218] (6) 拍干检测板, 用阅读仪读出对应位置的荧光值, 再根据标准曲线计算得到浓度值。结果见表5。
- [0219] 实施例10
- [0220] 未使用荧光方法加生物方法的双重信号放大系统:
- [0221] 检测方法如下:
- [0222] (1) 将过敏原用0.01M, pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如: 植物花粉类过敏原蛋白: 0.1~5.0mg/ml; 霉菌类过敏原蛋白: 1.0~5.0mg/ml; 动物皮屑类过敏原蛋白: 0.5~5.0mg/ml; 植物食物类过敏原蛋白: 1.0~7.0mg/ml; 动物食物类过敏原蛋白: 1.0~8.0mg/ml; 昆虫类过敏原蛋白: 1~5.0mg/ml等) 加50-100uL在酶标板相应位置的孔里, 4℃下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);
- [0223] (2) 加150uL/孔, 0.01M, pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。
- [0224] (3) 加100uL/孔, 0.01M, pH7.4的含2%BSA的PBS封闭, 4℃下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);
- [0225] (4) 加150uL/孔, 0.01M, pH7.4的含0.05%Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干, 备用。
- [0226] (5) 取包被有不同过敏原蛋白的酶标板, 室温下水平放置在板架上, 备用;
- [0227] (6) 将20~100μL血清或血浆加入酶标板中, 将板架置于摇床上, 室温孵育30~60分钟;
- [0228] (7) 用洗涤液洗板, 重复清洗3~5次, 每次10~30秒;
- [0229] (8) 将20~100μL HRP偶联的抗人IgG4抗体工作液加入酶标板中, 置于摇床上室温孵育30~60分钟;
- [0230] (9) 用洗涤液洗板, 重复清洗3~5次, 每次10~30秒, 拍干;
- [0231] (10) 每孔加入TMB显色液20~100μL, 置于摇床上室温孵育5~15分钟;
- [0232] (11) 用酶标仪进行判读。
- [0233] 表5血清样本中的过敏原特异性IgG4抗体水平检测结果

[0234]

患者	A			B			C		
	鸡蛋 过敏原 白	牛奶	小麦	鳕鱼	花生	大豆	蟹	虾	贝
实施例 9	1	1	4	2	3	4	3	4	1
实施例 10	0	0	3	1	2	1	2	0	0

[0235] 比较上表的检测结果可见,由于实施例10未使用荧光方法加生物化学方法的双重信号放大系统,检测灵敏度较低,使得2级以下的sIgG4抗体浓度未检出。

[0236] 实施例11

[0237] 使用荧光方法加生物方法(生物素-链霉亲和素法)的双重信号放大系统:

[0238] 检测试剂配制参见实施例4

[0239] 检测方法如下:

[0240] (1)取固化有不同过敏原蛋白的检测板,室温下水平放置在特制板架上,备用;

[0241] (2)将20~100 μ L血清或血浆分别加入检测板的每个反应槽中,将板架置于摇床上,室温孵育30~60分钟;

[0242] (3)用洗涤液冲洗反应槽,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0243] (4)将200~400 μ L荧光微球偶联的抗人IgA抗体用PBS1:10~1000稀释后分别加入检测板的每个反应槽中,置于摇床上室温孵育30~60分钟;

[0244] (5)用洗涤液冲洗检测板,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0245] (6)拍干检测板,用阅读仪读出对应位置的荧光值,再根据标准曲线计算得到浓度值。结果见表6。

[0246] 实施例12

[0247] 未使用荧光方法加生物方法的双重信号放大系统:

[0248] 检测方法如下:

[0249] (1)将过敏原用0.01M, pH 7.4的PBS配制成适合的浓度(如:植物花粉类过敏原蛋白:0.1~5.0mg/ml;霉菌类过敏原蛋白:1.0~5.0mg/ml;动物皮屑类过敏原蛋白:0.5~5.0mg/ml;植物食物类过敏原蛋白:1.0~7.0mg/ml;动物食物类过敏原蛋白:1.0~8.0mg/ml;昆虫类过敏原蛋白:1~5.0mg/ml等)加50-100 μ L在酶标板相应位置的孔里,4 $^{\circ}$ C下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);

[0250] (2)加150 μ L/孔,0.01M, pH7.4的含0.05% Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干。

[0251] (3)加100 μ L/孔,0.01M, pH7.4的含2% BSA的PBS封闭,4 $^{\circ}$ C下在摇床上缓慢地混合反应过夜(16小时以上);

[0252] (4)加150 μ L/孔,0.01M, pH7.4的含0.05% Tween 20的PBS清洗检测板1次后拍干,备用。

[0253] (5)取包被有不同过敏原蛋白的酶标板,室温下水平放置在板架上,备用;

[0254] (6)将20~100 μ L血清或血浆加入酶标板中,将板架置于摇床上,室温孵育30~60分钟;

[0255] (7)用洗涤液洗板,重复清洗3~5次,每次10~30秒;

[0256] (8)将20~100 μ L HRP偶联的抗人IgA抗体工作液加入酶标板中,置于摇床上室温孵育30~60分钟;

[0257] (9)用洗涤液洗板,重复清洗3~5次,每次10~30秒,拍干;

[0258] (10)每孔加入TMB显色液20~100 μ L,置于摇床上室温孵育5~15分钟;

[0259] (11)用酶标仪进行判读。

[0260] 表6血清样本中的过敏原特异性IgA抗体水平检测结果

患者		A			B			C		
[0261] 检测 结果	过敏原	鸡蛋 白	牛奶	小麦	鳕鱼	花生	大豆	蟹	虾	贝
	实施例 11	2	1	3	2	1	2	2	3	2
	实施例 12	1	0	2	0	0	1	1	2	0

[0262] 比较上表的检测结果可见,由于实施例10未使用荧光方法加生物化学方法的双重信号放大系统,检测灵敏度较低,使得2级以下(包含某些2级)的sIgA抗体浓度未检出。

[0263] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

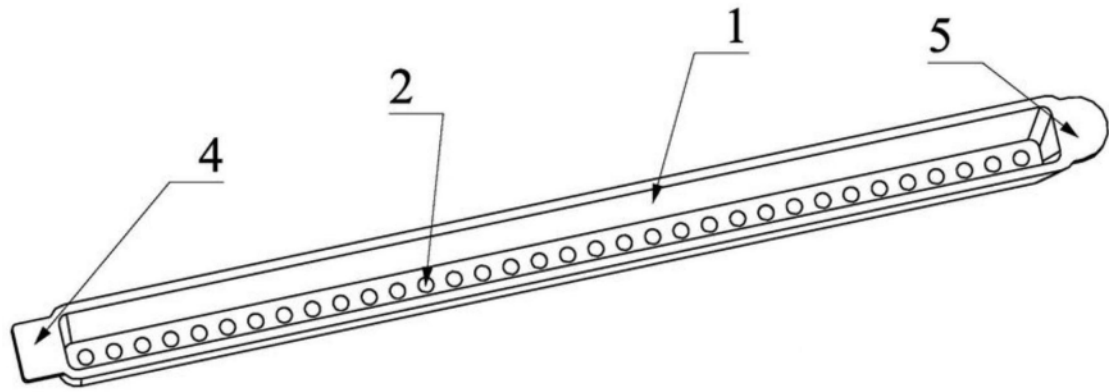


图1

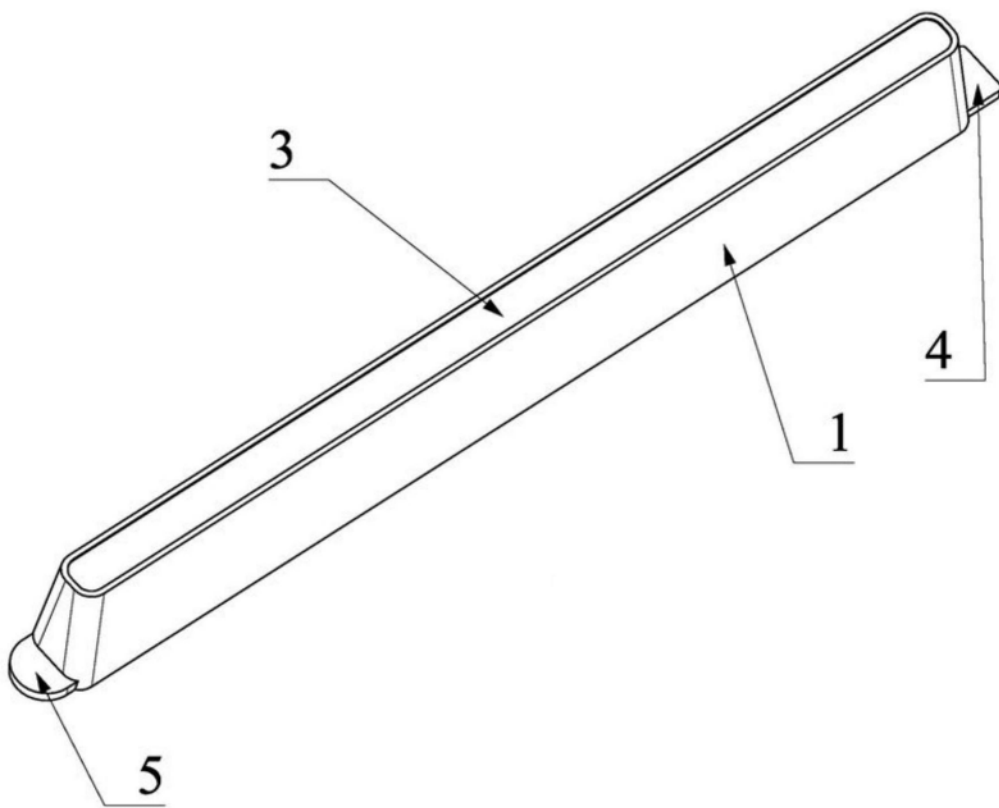


图2

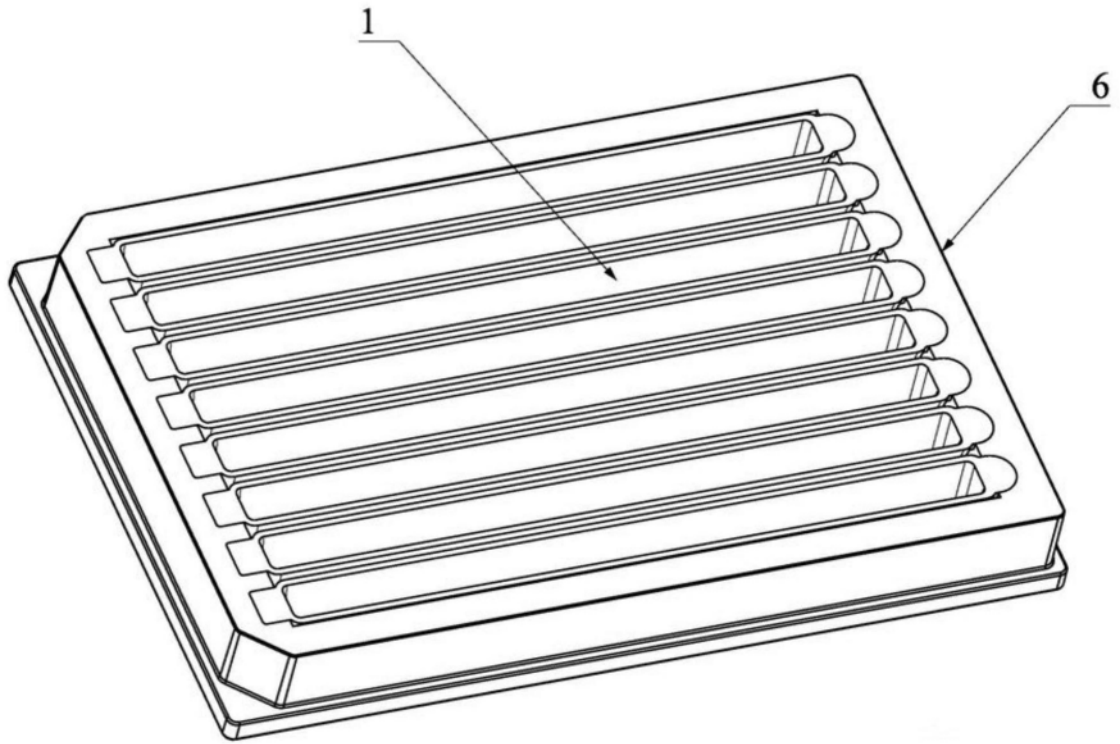


图3

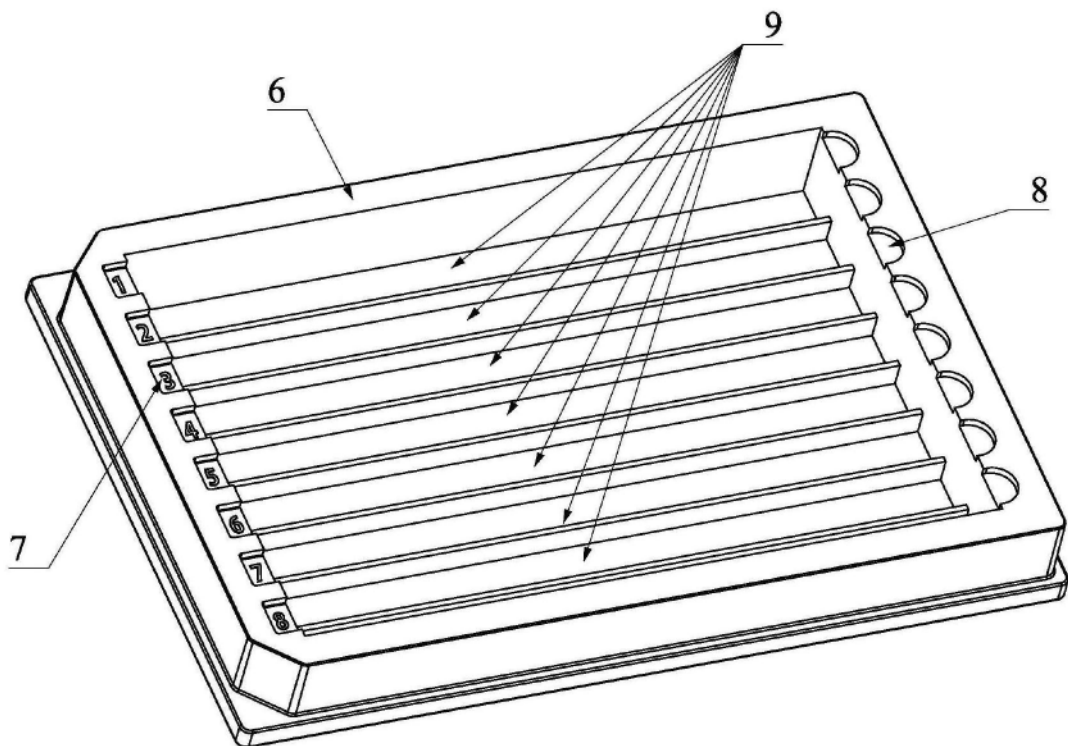


图4

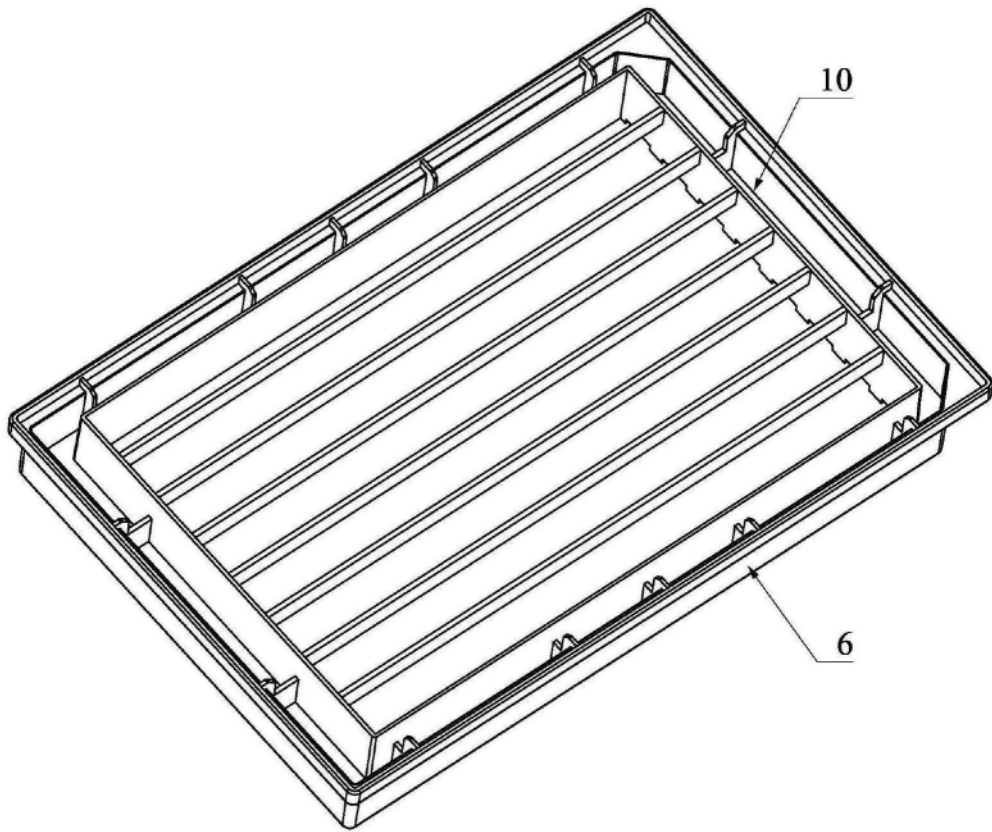


图5