

# 尘螨过敏原 Der p 1、Der p 2 特异性 IgE 化学发光免疫检测方法的建立及其性能评估

韩菲菲<sup>1</sup> 周鹰<sup>2</sup> 张建<sup>3</sup> 殷皓<sup>1</sup> 吴美丽<sup>2</sup> 陈茜<sup>3</sup> 崔玉宝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学附属无锡人民医院医学检验科, 无锡 214023; <sup>2</sup>南京医科大学附属无锡儿童医院儿科实验室, 无锡 214023, <sup>3</sup>南京医科大学附属无锡儿童医院医学检验科, 无锡 214023

通信作者: 崔玉宝, Email: ybcui1975@hotmail.com

**【摘要】** 目的 采用纳米磁微粒化学发光免疫技术建立尘螨过敏原第 1、2 组分(Der p 1、Der p 2) 特异性免疫球蛋白 E(sIgE) 的定量检测方法。方法 通过优化试剂组份和反应模式, 评估纳米磁微粒化学发光免疫技术检测 Der p 1、Der p 2 sIgE 的各项性能指标。同时检测 50 例疑似尘螨过敏患者血清 Der p 1、Der p 2 sIgE 水平, 与 Phadia 系统测定结果为标准进行比较, 其一致性的比较采用 *Kappa* 检验。结果 最佳实验体系为: 磁微粒用量 25  $\mu\text{g}$ , 反应缓冲液(pH 值 7.4) 含 0.1 mol/L Tris-HCl、质量分数 0.25% 酪蛋白, 包被液含 20 mmol/L 磷酸缓冲液(PB)、质量分数 1% 牛血清白蛋白(BSA), 发光增强液含体积分数 0.05% Triton X-100, 采用两步法免疫反应, 样本量为 20  $\mu\text{l}$ , 反应温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ 。检测体系最低检出限小于 0.01 kU/L, 线性范围 0.2~100.0 kU/L, 批内、批间精密密度分别小于 5%、7%, Der p 1 和 Der p 2 交叉污染率分别为 0.19%、0.21%。与 Phadia 系统测定结果比较, Der p 1 阳性、阴性符合率分别为 78.0%(32/41)、9/9, 一致性较好(*Kappa* = 0.65, *P* = 0.008); Der p 2 阳性、阴性符合率分别为 93.3%(28/30)、85.0%(17/20), 一致性也较好(*Kappa* = 0.79, *P* = 0.003)。结论 成功建立了尘螨过敏原 Der p 1、Der p 2 sIgE 纳米磁微粒化学发光免疫检测方法, 其各项性能指标良好, 与 Phadia 系统有较好的一致性。

**【关键词】** 免疫球蛋白 E; 抗原, 尘螨属; 欧洲屋尘螨; 化学发光测定法; 纳米粒子

**基金项目:** 国家自然科学基金(81971511); 江苏省第五期“333 工程”科研资助项目(BRA2017216); 江苏省重点研发计划(BE2018627); 无锡市卫生和计划生育委员会科研重大项目(Z201701)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20200817-00314

## Establishment and performance evaluation of Der p 1/Der p 2 specific immunoglobulin E detection for the components of dust mite allergens based on chemiluminescence immunoassay

Han Feifei<sup>1</sup>, Zhou Ying<sup>2</sup>, Zhang Jian<sup>3</sup>, Yin Hao<sup>1</sup>, Wu Meili<sup>2</sup>, Chen Xi<sup>3</sup>, Cui Yubao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China; <sup>2</sup>Pediatric Laboratory, Wuxi Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China; <sup>3</sup>Department of Medical Laboratory, Wuxi Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China

Corresponding author: Cui Yubao, Email: ybcui1975@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To establish a quantitative detection method for the main components of dust mite allergens Der p 1, Der p 2 specific immunoglobulin E (sIgE) by using the nano-magnetic particle chemiluminescence immunoassay. **Methods** The performance indexes of the established method were evaluated after setting up and optimizing the chemiluminescence detection system and immune reaction conditions of sIgE for dust mite allergen. Serum sIgE levels of 50 suspected allergic patients with dust mite were determined by this chemiluminescence method. At the same time, this method was compared with the Phadia kit and the consistency was analyzed by *Kappa* test. **Results** The optimal amount of magnetic beads was 25  $\mu\text{g}$ , the optimal reaction buffer (pH=7.4) contained 0.1 mol/L Tris-HCl and 0.25% (W/W) casein, the optimal coating solution contained 20 mmol/L phosphate buffer (PB) and 1% (W/W) bovine serum albumin (BSA), and the luminescence enhancement solution contained 0.05% (V/V) Triton X-100. The two-step immunoreaction was adopted, and the detection could be completed with 20  $\mu\text{l}$  sample at the optimal reaction temperature of 37 $^{\circ}\text{C}$ . The limit of detection (LOD) of the established nano-magnetic particle chemiluminescence system in detecting Der p 1 and Der p 2 sIgE antibodies were both less than 0.01 kU/L, with the linear range of 0.2–100.0 kU/L, the precision of less than 7%, and the cross contamination rate of

0.19% and 0.21%. Compared with the Phadia system, the positive and negative coincidence rate of Der p 1 were 78.0%(32/41) and 9/9 with good consistency ( $Kappa=0.65$ ,  $P=0.008$ ), and the positive and negative coincidence rate of Der P 2 were 93.3%(28/30) and 85.0%(17/20) with good consistency ( $Kappa=0.79$ ,  $P=0.003$ ). **Conclusion** The nano-magnetic particle chemiluminescence immunoassay is successfully established for detecting dust mite allergen sIgE, which has good detection performance and good consistency with Phadia system.

**【Key words】** Immunoglobulin E; Antigens, dermatophagoides; Dermatophagoides pteronyssinus; Chemiluminescent measurements; Nanoparticles

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81971511); 333 Project of Jiangsu Province (BRA2017216); Primary Research & Development Plan of Jiangsu Province (BE2018627); Project of Wuxi Health and Family Planning Commission (Z201701)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200817-00314

尘螨是重要和常见的室内吸入性过敏原之一, 对人体的致敏阳性率高达 70%~80%<sup>[1-2]</sup>。每种螨体均含许多种蛋白质, 但患者病因可能只与其中的某种或某些致敏成份有关, 这些成份叫做“组分”。在已命名的尘螨过敏原众多组分中, 第 1、2 组分 (Der p 1、Der p 2) 可诱导 80% 过敏性疾病患者产生辅助性 T 细胞 2 (T helper cell 2, Th2) 型细胞因子, 并诱导机体产生高浓度的免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) E 抗体<sup>[3]</sup>。迄今应用于临床检测的诊断试剂均采用单种螨提取物, 该提取物为过敏原多种组分的混合物, 且不同螨种之间也存在交叉反应, 使用这种粗提物会引起临床误诊及不良反应。本研究计划获得 Der p 1、Der p 2 的重组过敏原制品, 利用组分制品优化并建立特异性 IgE (specific IgE, sIgE) 抗体化学发光免疫检测方法, 在分子水平明确引起过敏性疾病的致敏成份, 实现组分分辨诊断, 为尘螨过敏性疾病的精准医学检验奠定基础。

## 材料和方法

1. 主要仪器与试剂。从无锡人民医院儿科实验室培养的尘螨提取 RNA, 制备 Der p 1、Der p 2 重组蛋白, 并通过十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 和 Western blotting 鉴定<sup>[4-5]</sup>。N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、磁微粒均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 甘氨酸、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PB)、碳酸盐缓冲液 (carbonate buffer, CB)、酪蛋白均购自美国 Gentex 公司。NRM411 全自动化学发光定量检测平台购自南京诺尔曼生物技术有限公司; Phadia 1000 过敏原分析仪及其配套 Der p 1、Der p 2 sIgE 检测试剂盒 (免疫荧光法) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

2. 样本来源。筛选 2019 年 6 月至 2019 年 12 月 在无锡人民医院就诊的 50 例疑似尘螨过敏 [过敏

性鼻炎和 (或) 哮喘] 门诊患者及 30 名健康体检者 (经临床检查排除呼吸系统疾病, 无哮喘及其他过敏性疾病史), 采集受试者空腹外周静脉全血 5 ml, 室温 3 000 转/min (离心半径 15 cm) 离心 10 min, 编号后留取上层血清 -20℃ 冷冻保存。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则。

3. 反应体系建立。(1) 磁微粒用量。Der p 1、Der p 2 重组蛋白与 NHS 活化的长链生物素混合、标记后, 以甘氨酸封闭, 然后透析, 用磁微粒储存液保存已标记的生物素化抗原。取不同量的链霉亲和素化磁微粒, 使用相同量的生物素化抗原包被, 在同一反应缓冲液中测试高值 (50 kU/L) 血清样本的发光信号强度 (reactive luminous intensity, RLU) 值。

(2) 包被液成分和浓度的选择。配制含 3 种不同 BSA 浓度 (质量分数 0.5%、1%、2%)、3 种不同 PB 浓度 (10、20 和 30 mmol/L) 的包被液分别包被相同的生物素化尘螨过敏原, 在同一反应缓冲液中测试高值 (50 kU/L)、低值 (2.5 kU/L) 血清样本的 RLU 值, 计算两者比值。

(3) 发光增强液浓度选择。采用 10  $\mu$ l 含不同浓度 (体积分数 0%、0.025%、0.05%、0.1%、0.2%) 的 Triton X-100 增强液进行测试并比较 RLU 值。

(4) 发光增强液的灵敏度及稳定性。选取浓度值接近检测下限的血清样本 (0.40、0.30、0.20 和 0.15 kU/L) 测试其 RLU 值, 计算 CV, CV  $\leq$  10% 认为结果可靠。将配制好的发光增强液同时置于 4℃ 和 37℃ 的环境中储存, 分别于第 0、1、3、5、7、10、14、21、28 天选取 10  $\mu$ l 测试其 RLU 值, 计算各时间点 37℃ 较 4℃ 的 RLU 值相对降幅。

(5) 缓冲液成分及 pH 值的选择。配制 6 种不同组分浓度 (分别为 0.1 mol/L Tris-HCl、质量分数 0.25% 酪蛋白; 0.1 mol/L Tris-HCl、质量分数 1% BSA; 20 mmol/L PB、质量分数 0.25% 酪蛋白; 20 mmol/L PB、质量分数 1% BSA; 20 mmol/L CB、质量分数 0.25% 酪蛋白;

20 mmol/L CB、质量分数 1% BSA) 含吲哚酯鼠抗人 IgE 单克隆抗体的标记反应缓冲液测试高值(50 kU/L)、低值(2.5 kU/L)血清 RLU 值,计算两者比值;依次配制 pH 值分别为 6.5、7.4 和 9.5 的标记反应缓冲液,测试高值(50 kU/L)血清 RLU 值。

(6) 免疫反应条件。一步法(直接法)为磁微粒、样本、反应缓冲液混合温育后清洗;两步法(间接法)为磁微粒、样本混合清洗后,再加反应缓冲液温育清洗。两种方法分别测试高值(50 kU/L)、低值(2.5 kU/L)血清 RLU 值,计算两者比值。分别采用 20、50、100  $\mu$ l 样本加样量,其余条件不变的情况下测试高值(50 kU/L)、低值(2.5 kU/L)血清 RLU 值,计算两者比值。测试 25  $^{\circ}$ C、30  $^{\circ}$ C、37  $^{\circ}$ C 和 40  $^{\circ}$ C 反应温度下高值(50 kU/L)、低值(2.5 kU/L)血清 RLU 值,计算两者比值。

4. 性能指标评价<sup>[6]</sup>。(1) 最低检出限(limit of detection, LOD):用样本稀释液作为样本进行 20 次重复测定,计算测定浓度  $\bar{x}$  和  $s$ ,得出  $\bar{x}+2s$ ,代入标准曲线计算得到的浓度值即为 LOD。(2) 稀释线性:将测定值为 100 kU/L 的血清样本用稀释液进行倍比稀释,最终稀释浓度  $\leq 0.35$  kU/L,每个稀释样本重复测定 3 次后计算浓度值,将测定的平均浓度与理论浓度以最小二乘法线性拟合,剔除离群值后回归拟合,并对回归方程进行线性检验。(3) 精密度:选择高(50 kU/L)、中(20 kU/L)、低(2.5 kU/L) 3 个不同浓度值的血清样本各重复检测 8 次,计算批内精密度;选择高、中、低 3 个不同浓度值的血清样本连续测定 10 d,计算批间精密度。(4) 交叉污染率:取混匀后的高浓度(50 kU/L)样本连测 3 次,测定值为 H1、H2、H3,再取低浓度(2.5 kU/L)样本连测 3 次,测定值为 L1、L2、L3,交叉污染率 =  $(L1-L3)/(H3-L3) \times 100\%$ 。

5. 方法学比对。利用建立的纳米磁微粒化学发光免疫分析法检测 50 例疑似尘螨过敏患者血清,并以 Phadia 系统测试结果为标准进行比较。依据 Phadia 系统将 0.35 kU/L 作为界值进行判定, $< 0.35$  kU/L 为阴性, $\geq 0.35$  kU/L 为阳性。阳性符合率 = Phadia 阳性样本中化学发光法阳性例数/Phadia 阳性样本数  $\times 100\%$ ;阴性符合率 = Phadia 阴性样本中化学发光法阴性例数/Phadia 阴性样本数  $\times 100\%$ 。

6. 统计学处理。采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料以频数(百分比)表示。一步法和两步法检测的 RLU 比值的比较采用两独立样本  $t$  检验;与 Phadia 系

统检测结果的一致性分析采用 Kappa 检验( $Kappa \geq 0.60$  表示一致性较好)。 $P < 0.05$  为差异或一致性有统计学意义。

## 结 果

1. 反应体系建立。(1) 磁微粒用量。在同一反应缓冲液中,10、15、20、25 和 30  $\mu$ g 链霉亲和素化磁微粒的 RLU 值分别为 86 052  $\pm$  9 103、141 757  $\pm$  11 346、172 566  $\pm$  15 840、201 590  $\pm$  20 341、201 431  $\pm$  19 389,结果示 25  $\mu$ g 为最佳磁微粒量。

(2) 包被液成分及浓度选择。含质量分数 0.5%、1%、2% BSA 的包被液的高、低值样本 RLU 比值分别为 21.49  $\pm$  1.72、22.10  $\pm$  1.64、18.30  $\pm$  1.93,含 10、20 和 30 mmol/L PB 的包被液的高、低值样本 RLU 比值分别为 19.31  $\pm$  1.51、24.79  $\pm$  2.01、13.57  $\pm$  1.43,结果示含质量分数 1% BSA、20 mmol/L PB 的包被液是最合适的浓度组合。

(3) 发光增强液的浓度选择。10  $\mu$ l 含不同浓度(体积分数 0%、0.025%、0.05%、0.1%、0.2%)的 Triton X-100 增强液的 RLU 值分别为 347  $\pm$  26、149 344  $\pm$  10 305、356 907  $\pm$  18 415、330 188  $\pm$  14 932、337 026  $\pm$  11 821,结果示含体积分数 0.05% Triton X-100 的增强液发光效率最高。

(4) 发光增强液的灵敏度及稳定性。0.40、0.30、0.20 和 0.15 kU/L 浓度下血清样本 RLU 值的 CV 分别为 2.6%、4.0%、9.6% 和 10.1%,提示最适检测下限为 0.20 kU/L。发光增强液在第 0、1、3、5、7、10、14、21 和 28 天的 37  $^{\circ}$ C 较 4  $^{\circ}$ C 的 RLU 值相对降幅分别为 3%、6%、-7%、0%、-9%、-6%、-1%、0% 和 -2%,表明发光增强液于 37  $^{\circ}$ C 至少可保存 28 d,稳定性较好。

(5) 缓冲液成份及 pH 值的选择。6 种不同组份浓度的反应缓冲液高、低值样本的 RLU 比值分别为 19.36  $\pm$  1.27、13.75  $\pm$  1.19、17.73  $\pm$  1.38、12.13  $\pm$  1.21、17.55  $\pm$  1.43、11.88  $\pm$  0.97,pH 值为 6.5、7.4 和 9.5 的反应缓冲液的 RLU 值分别为 196 879  $\pm$  11 760、298 566  $\pm$  15 974 和 89 135  $\pm$  6 682,结果示含 0.1 mol/L Tris-HCl、质量分数 0.25% 酪蛋白、pH 值为 7.4 为最适反应缓冲液。

(6) 免疫反应条件。一步法、两步法检测高、低值样本的 RLU 比值分别为 1.12  $\pm$  0.10、33.40  $\pm$  3.78,两步法明显优于一步法( $t = 20.91$ , $P = 0.001$ )。20、50 和 100  $\mu$ l 样本加样量的高、低值样本 RLU 比值分别为 18.12  $\pm$  1.21、16.73  $\pm$  1.15 和 12.21  $\pm$  0.74;反应温度为 25  $^{\circ}$ C、30  $^{\circ}$ C、37  $^{\circ}$ C 和 40  $^{\circ}$ C 的高、低值样本



RLU 比值分别为  $25.64 \pm 1.20$ 、 $25.86 \pm 1.07$ 、 $26.32 \pm 1.13$  和  $22.70 \pm 1.21$ 。结果表明,最适反应条件为 20  $\mu\text{l}$  样本量、37  $^{\circ}\text{C}$  反应温度。

2.性能指标评价。(1)LOD 测定。重复测定样本稀释液 20 次,计算得到 Der p 1、Der p 2 的 LOD 均小于 0.01 kU/L。(2)稀释线性试验。Der p 1 线性回归方程为: $y = 1.0623x + 0.1953$  ( $r = 0.999$ ), Der p 2 线性回归方程为: $y = 1.0935x + 0.0219$  ( $r = 0.999$ ), Der p 1 和 Der p 2 在 0.2~100.0 kU/L 均呈现较好的线性关系。(3)精密度分析。使用高、中、低 3 个不同浓度测定批内精密度均小于 5%,批间精密度均小于 7%(表 1)。(4)交叉污染率。Der p 1 和 Der p 2 的交叉污染率分别为 0.19% 和 0.21%。

3.方法学比对。尘螨过敏原 Der p 1 阳性符合率为 78.0% (32/41),阴性符合率为 9/9,与 Phadia 系统检测结果的一致性较好 ( $Kappa = 0.65$ ,  $P = 0.008$ );尘螨过敏原 Der p 2 的阳性符合率为 93.3% (28/30),阴性符合率为 85.0% (17/20),与 Phadia 系统检测结果的一致性也较好 ( $Kappa = 0.79$ ,  $P = 0.003$ )。

## 讨 论

目前全球过敏性疾病患者总发病率达 15%~30%,而我国现有患病人数约 2 亿人口,且发病率有逐年上升的趋势;该疾病是危害人类健康的重要公共卫生问题之一,严重者甚至有生命危险<sup>[7]</sup>。临床工作中很多患者因无法确定过敏原,给疾病的预防和治疗带来了很大困难。过敏性疾病不仅影响患者生活质量,还会给个人、社会造成严重的经济负担。尘螨作为全球分布的优势螨种是最常见的过敏原来源物质之一,其致敏的过敏性疾病患者占全球 10% 以上的人口总数<sup>[7]</sup>。体外试验已证实尘螨粗提浸液中有 30 多种成份可与过敏性疾病患者血清 IgE 发生结合,按其发现顺序先后依次命名为第 1 组分、第 2 组分等。Der p 1、Der p 2 作为尘螨重要的致敏蛋白组分与过敏性哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎等过敏性疾病密切相关,且二者之间无交叉反应性<sup>[8]</sup>。而尘螨非致敏原蛋白[肽基脯氨酸顺/反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase, Pplase)]在

过敏性疾病发病中也可起到加重过敏反应和炎症反应的协同作用<sup>[9]</sup>。有报道显示,单纯 Pplase 存在状态下,实验小鼠不表现出哮喘症状和血清学变化,但与 Der p 1 联合作用时,则可加重气道高反应性和肺组织病理变化,血清中 sIgE 和白细胞介素-4 显著升高,进一步促进 Th2 细胞极化<sup>[9-10]</sup>。

过敏原检测方法主要基于体内、体外 2 种方法。体内试验是直接将过敏原作用于人体,通过直接观察人体的过敏反应而作出结果评价,以皮肤点刺试验、斑贴试验、激发试验多见,这些方法不仅可能引起严重的不良反应,还易受实验者操作手法、年龄、药物、个体差异等影响<sup>[11]</sup>。针对某种过敏原的 sIgE 抗体是介导过敏性疾病反应的一类重要效应分子,通过酶联免疫吸附实验、放射性变应原吸附实验、荧光酶联免疫、蛋白质印迹等体外实验,检测患者血清 sIgE 抗体成为过敏性疾病的主要诊断方法,且研究表明患者血清中的 sIgE 浓度与过敏性疾病的严重程度呈一定正相关<sup>[12]</sup>,对该病预防、明确病因及诊疗具有重要意义。但无论是体内还是体外诊断过敏性疾病的方法,均采用质量欠佳的单一过敏原粗提浸液混合物,这种粗提物可以鉴定出患者因某种致敏原过敏,但无法明确因何种过敏原单组分致敏。目前免疫荧光法的 Phadia 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)是体外检测单一致敏原的国际“金标准”<sup>[13]</sup>,但因进口试剂昂贵而难以普及推广,且不同国家地区同一过敏原组分存在多态性差异,同一组分在不同批次产品中含量也不均一,难以实现产品的标准化,影响临床实验诊断的特异性和疗效,导致临床应用价值下降。

化学发光免疫学方法是将特异性抗原抗体反应与灵敏的化学发光相结合而建立的一种免疫学诊断检测方法,具有低成本、灵敏度高、简便快速、安全无污染等特点,还可一次性检测 20 余种常见的吸入、食物性过敏原<sup>[14]</sup>。本研究将纳米磁微粒化学发光免疫法整合了磁微粒固相载体包被技术和化学发光检测系统,采用间接法体外定量检测患者血清中尘螨过敏原主要单组分 sIgE 抗体,即待检患者血清中的 Der p 1、Der p 2 sIgE 可与生物素化的尘螨过敏

表 1 精密度检测结果(CV,%)

过敏原	批内精密度			批间精密度		
	低值(2.5 kU/L)	中值(20 kU/L)	高值(50 kU/L)	低值(2.5 kU/L)	中值(20 kU/L)	高值(50 kU/L)
Der p 1	3.84	2.97	3.03	6.21	6.34	5.77
Der p 2	4.02	2.82	2.93	6.16	5.53	6.25

注:批内测定 8 次,批间测定 10 次;Der p 1、Der p 2 分别为尘螨过敏原第 1、2 组分

原、链霉亲和素包被的磁微粒发生免疫反应,在洗去非特异性 IgE 后加入吖啶酯标记的抗人 IgE 单克隆二抗,形成抗原抗体复合物,经温育洗去未结合物后,继续与发光底物增强液进行温育,终止反应后测定 RLU 值,用于评价分析待测患者血清中尘螨过敏原 Der p 1、Der p 2 sIgE 的浓度水平。本研究建立的 Der p 1、Der p 2 sIgE 检测方法其 LOD、线性范围、批内及批间精密性、交叉污染率等性能指标均基本满足临床要求。此外,初步实验结果表明,当乳糜 $<10\text{ mg/L}$ 、胆红素 $<166\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白 $<7.5\text{ g/L}$ 时对 Der p 1、Der p 2 sIgE 的测定无显著性干扰(数据暂未发表)。

综上所述,Der p 1、Der p 2 sIgE 纳米磁微粒化学发光免疫检测方法灵敏度高、特异性强、检测范围宽、稳定性好及可高通量检测,为相关试剂研发和尘螨过敏性疾病精准防治提供科学依据。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 韩菲菲:研究实施、论文撰写;周鹰、张建、殷皓:研究实施、研究指导;吴美丽:统计分析;陈茜:研究实施;崔玉宝:论文修改、经费支持

## 参 考 文 献

- [1] Yin SC, Liao EC, Ye CX, et al. Effect of mite allergenic components on innate immune response: Synergy of protease (Group 1 & 3) and non-protease (Group 2 & 7) allergens[J]. Immunobiology, 2018, 223(6-7): 443-448. DOI:10.1016/j.imbio.2017.10.032.
- [2] Arrais M, Maricoto T, Cooper P, et al. Helminth infections, atopy, asthma and allergic diseases: protocol for a systematic review of observational studies worldwide [J]. BMJ Open, 2020, 10(5): e038085. DOI:10.1136/bmjopen-2020-038085.
- [3] Miranda DO, Silva DA, Fernandes JF, et al. Serum and salivary IgE, IgA, and IgG4 antibodies to Dermatophagoides pteronyssinus and its major allergens, Der p 1 and Der p 2, in allergic and non-allergic children [J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011: 302739. DOI:10.1155/2011/302739.
- [4] 刘良,周鹰,崔玉宝,等.屋尘螨变应原 Der p 1 基因的克隆和原核表达[J].中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(6): 477-482. DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.2007.06.015.  
Liu L, Zhou Y, Cui YB, et al. Cloning and expression of group 1 allergen of Dermatophagoides pteronyssinus[J]. Chin J Vector Bio & Control, 2007, 18(6): 477-482. DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.2007.06.015.
- [5] 刘良,周鹰,彭江龙,等.尘螨变应原 Der p 2 基因克隆及原核表达[J].中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19(4): 320-323.

DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.2008.04.014.

- Liu L, Zhou Y, Peng JL, et al. Cloning and expression of Der p 2 allergen of Dermatophagoides pteronyssinus[J]. Chin J Vector Bio & Control, 2008, 19(4): 320-323. DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.2008.04.014.
- [6] 王治国.临床检验方法确认与性能验证[M].北京:人民卫生出版社, 2009.  
Wang ZG. Method Validation and Performance Verification [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009.
- [7] Patel N, Herbert L, Green TD. The emotional, social, and financial burden of food allergies on children and their families [J]. Allergy Asthma Proc, 2017, 38(2): 88-91. DOI:10.2500/aap.2017.38.4028.
- [8] Bronnert M, Mancini J, Birnbaum J, et al. Component-resolved diagnosis with commercially available D. pteronyssinus Der p 1, Der p 2 and Der p 10: relevant markers for house dust mite allergy[J]. Clin Exp Allergy, 2012, 42(9): 1406-1415. DOI:10.1111/j.1365-2222.2012.04035.x.
- [9] Wang H, Mo L, Xiao X, et al. Pplase of Dermatophagoides farinae promotes ovalbumin-induced airway allergy by modulating the functions of dendritic cells in a mouse model[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43322. DOI:10.1038/srep43322.
- [10] Cui Y, Teng F, Yu L, et al. Sequential epitopes of dermatophagoides farinae allergens identified using peptide microarray-based immunoassay[J]. IUBMB Life, 2016, 68(10): 792-798. DOI:10.1002/iub.1540.
- [11] 曾万杰,樊一笋,耿春松,等.纳米磁微粒化学发光免疫分析法检测过敏原特异性免疫球蛋白 E 性能评估[J].第二军医大学学报, 2018, 39(1): 68-73. DOI:10.16781/j.0258-879x.201801.0068.  
Zeng WJ, Fan YS, Geng CS, et al. Performance of magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay in detection of allergen specific immunoglobulin E[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(1): 68-73. DOI:10.16781/j.0258-879x.201801.0068.
- [12] Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International consensus on allergy immunotherapy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(3): 556-568. DOI:10.1016/j.jaci.2015.04.047.
- [13] Johansson SG. ImmunoCAP Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(3): 273-279. DOI:10.1586/14737159.4.3.273.
- [14] 俞蕾,肖华龙,刘洁,等.人高迁移率族蛋白 B1 光激化学发光分析法的建立及应用[J].中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(7): 489-492. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.07.008.  
Yu L, Xiao HL, Liu J, et al. Establishment and application of light initiated chemiluminescence assay of high mobility group box 1[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(7): 489-492. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.07.008.

(收稿日期:2020-08-17)