



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112710837 B

(45) 授权公告日 2022.05.17

(21) 申请号 202011210352.1

G01N 33/543 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.03

G01N 33/58 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112710837 A

(56) 对比文件

CN 103575912 A, 2014.02.12

CN 109061184 A, 2018.12.21

(43) 申请公布日 2021.04.27

US 2018024131 A1, 2018.01.25

(73) 专利权人 浙江大学  
地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

CN 106967696 A, 2017.07.21

CN 101988925 A, 2011.03.23

审查员 陈剑锋

(72) 发明人 高中山 赵岚 高毕远 付婉艺

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224  
专利代理师 沈金龙

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

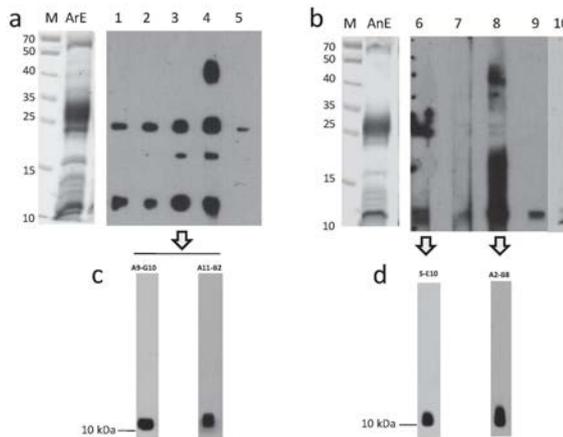
权利要求书1页 说明书7页  
序列表2页 附图5页

## (54) 发明名称

一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法,使用双单抗夹心酶联免疫吸附实验进行定量,其中结合一抗为A2-B8单抗,来自杭州艾乐吉生物科技有限公司,货号MA-A2B8;检测二抗为A9-G10单抗,来自杭州艾乐吉生物科技有限公司,货号MA-A9G10。本发明一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法具有较高的灵敏性和特异性,能够定量常见蒿属花粉中Artv 3类型过敏原。



1. 一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法,其特征在于,使用双单抗夹心酶联免疫吸附实验进行定量,其中一抗为A2-B8单抗,来自杭州艾乐吉生物科技有限公司,货号MA-A2B8;二抗为A9-G10单抗,来自杭州艾乐吉生物科技有限公司,货号MA-A9G10,

蒿属植物为黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、细裂叶莲蒿、大籽蒿、野艾蒿或北艾。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,二抗用生物素标记。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,使用HRP标记的羊抗鼠IgG结合二抗后再加TMB避光显色后进行吸光值检测。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,使用蒿属植物对应的nsLTP过敏原标准品进行检测得到吸光值后绘制标准曲线,将待检测的蒿属植物花粉样品检测得到的吸光值代入标准曲线计算得到相应浓度。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,北艾用rArt v 3.0201标准品,黄花蒿或细裂叶莲蒿用nArt an 3标准品,艾蒿或野艾蒿用nArt ar 3标准品,茵陈蒿用nArt ca 3标准品,大籽蒿用nArt si 3标准品。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,rArt v 3.0201标准品的最低检测阈值为0.25ng/ml,最佳浓度测定范围为2-128ng/ml;nArt an 3标准品的最低检测阈值为0.25ng/ml,最佳浓度测定范围为2-128ng/ml;nArt ar 3标准品的最低检测阈值为2ng/ml,最佳浓度测定范围为4-128ng/ml;nArt ca 3标准品的最低检测阈值为0.5ng/ml,最佳浓度测定范围为4-128ng/ml;nArt si 3标准品的最低检测阈值为1ng/ml,最佳浓度测定范围为8-256ng/ml。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,一抗和二抗的使用浓度均为3 $\mu$ g/ml。

## 一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术检测技术领域,特别是涉及一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法。

### 背景技术

[0002] 蒿属植物花粉是造成夏秋季节过敏性疾病的主要致敏原之一,据统计,在我国有11.3%的呼吸道过敏性疾病患者对蒿属花粉过敏,北方地区尤为严重(超过50%)。我国蒿属植物分布广泛,种类繁多,其中黄花蒿(*Artemisia annua*)、艾蒿(*A. argyi*)、大籽蒿(*A. sieversiana*)、茵陈蒿(*A. capillaris*)、野艾蒿(*A. lavandulifolia*)最为常见,目前用于体外诊断和免疫治疗的花粉提取物主要来自大籽蒿。

[0003] 已经鉴定到的蒿花粉过敏原共7种,按照国际免疫学会联合会(I.U.I.S)下属的过敏原命名专门委员会(Allergen Nomenclature Sub-committee)(<http://www.allergen.org>)制定的过敏原命名规则,依次命名为Art v 1-6(来源于*A. vulgaris*)以及来源于黄花蒿(*A. annua*)的Art an 7。其中第一组分(Art v 1)和第三组分(Art v 3)是主要过敏原,Art v 1属于类防御素蛋白,被视为蒿花粉过敏的标志过敏原,超过80%的蒿过敏患者对其敏感。Art v 3属于病程相关蛋白第14家族中的非特异性脂质转移蛋白(nsLTP),分子量大小为9KDa,主要分布在花粉壁上,在欧洲,约有70%的蒿花粉过敏患者对其敏感,而我国约有25%-66%的患者对其敏感,这种蛋白作为泛过敏原存在于很多种植物中,能够引起广泛的交叉过敏反应,尤其是与蔷薇科水果之间,诱发呼吸道、胃肠道、口腔等的过敏症状,严重影响患者的生活质量。

[0004] 目前用于临床诊断和脱敏治疗的制剂主要是花粉提取物,而这些提取物由于种类和批次不同,其中所包含的过敏原有效成分差异很大,有些重要的过敏原在提取物中含量很低,用于诊疗中常出现漏检或脱敏治疗效果不显著等问题,因此,为了提高临床诊疗效率,对提取物中的主要过敏原进行定量是非常重要的。用于过敏原定量的方法包括酶联免疫吸附法(ELISA),质谱以及其他的分子生物学手段如PCR等,其中双夹心酶联免疫吸附实验是最常用的过敏原定量方法,尤其在检测微量过敏原方面有很高的应用价值,现在已经开发出很多可以用于单一过敏原组分定量的检测试剂盒,如丹麦ALK公司开发的用于Art v 1定量的单抗和多抗组合的酶联免疫(ELISA)检测试剂,桃果实中的nsLTP过敏原(Pru p 3)检测试剂等。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种用于蒿花粉中Art v 3(nsLTP)类型过敏原定量的方法,该方法具有较高的灵敏性和特异性,能够定量常见蒿属花粉中Art v 3类型过敏原。

[0006] 利用双单抗夹心酶联免疫吸附实验对我国主要的蒿属花粉提取物(黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、大籽蒿、野艾蒿、细裂叶莲蒿(*A. gmelinii*))中的nsLTP过敏原进行定量。

[0007] 本发明包含以黄花蒿和艾蒿花粉提取物免疫小鼠,生产并筛选蒿花粉Art v 3类

型过敏原的特异性单克隆抗体4种(A11-B2,A9-G10,5-E10,A2-B8),对4种单抗的亚型和效价进行检测,然后用这4种单抗进行结合实验,筛选出与各种蒿亲和力较强的单抗(A2-B8和A9-G10),并用这些单抗进行进一步的配对实验,筛选出用于双夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)的最适浓度。4种单抗都来源于杭州艾乐吉生物科技有限公司,其中A11-B2单抗的货号为MA-A11B2,A9-G10单抗的货号为MA-A9G10,5-E10单抗的货号为MA-5E10,A2-B8单抗的货号为MA-A2B8。

[0008] 本发明提供了6种我国常见蒿属花粉中Art v 3类型过敏原的氨基酸序列,每种花粉中各鉴定到两种不同亚型,依据IUIS的过敏原命名规则进行命名。与Art v 1相比,Art v 3在不同蒿属花粉中的序列变异更大。

[0009] 本发明包含用单克隆抗体(A2-B8)纯化6种花粉提取物中的Art v 3类型过敏原,通过电泳(SDS-PAGE)和质谱(LC-MS/MS)对纯化产物进行鉴定,以BCA法测定纯化出的过敏原浓度,并将其用作标准品对不同蒿花粉提取物中的Art v 3类型过敏原进行定量。

[0010] 本发明还包含对各种蒿花粉提取物的浓度进行筛选,选择花粉提取物的OD450值处于最佳拟合区间的稀释浓度,进行Art v 3的定量。

[0011] 一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法,使用双单抗夹心酶联免疫吸附实验进行定量,其中一抗为A2-B8单抗,来自杭州艾乐吉生物科技有限公司,货号MA-A2B8;二抗为A9-G10单抗,来自杭州艾乐吉生物科技有限公司,货号MA-A9G10。

[0012] 优选的,二抗用生物素标记。进一步优选的,使用HRP标记的羊抗鼠IgG结合二抗后再加TMB避光显色后进行吸光值检测。进一步优选的,使用蒿属植物对应的nsLTP过敏原标准品进行检测得到吸光值后绘制标准曲线,将待检测的蒿属植物花粉样品检测得到的吸光值代入标准曲线计算得到相应浓度。进一步优选的,北艾用rArt v 3.0201标准品,黄花蒿或细裂叶莲蒿用nArt an 3标准品,艾蒿或野艾蒿用nArt ar 3标准品,茵陈蒿用nArt ca 3标准品,大籽蒿用nArt si 3标准品。进一步优选的,rArt v 3.0201标准品的最低检测阈值为0.25ng/ml,最佳浓度测定范围为2-128ng/ml;nArt an 3标准品的最低检测阈值为0.25ng/ml,最佳浓度测定范围为2-128ng/ml;nArt ar 3标准品的最低检测阈值为2ng/ml,最佳浓度测定范围为4-128ng/ml;nArt ca 3标准品的最低检测阈值为0.5ng/ml,最佳浓度测定范围为4-128ng/ml;nArt si 3标准品的最低检测阈值为1ng/ml,最佳浓度测定范围为8-256ng/ml。

[0013] 优选,一抗和二抗的使用浓度均为3 $\mu$ g/ml。

[0014] 优选的,蒿属植物为黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、细裂叶莲蒿、大籽蒿、野艾蒿或北艾。

[0015] 本发明一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法具有较高的灵敏性和特异性,能够定量常见蒿属花粉中Art v 3类型过敏原。

[0016] 本发明一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法选用了5种序列上具有代表性的Art v 3类型过敏原作为标准品,使得定量结果更为准确,能够实现对大多数蒿属植物Art v 3类型过敏原的定量。

## 附图说明

[0017] 图1为用黄花蒿(A.annua)和艾蒿(A.argyi)花粉提取物免疫小鼠,经过一系列筛选(用重组的rArt v 3.0201)后所得到的4种蒿花粉Art v 3同种型过敏原的单克隆抗体。

其中A9-G10和A11-B2来自艾蒿(图1a,c),5-E10和A2-B8来自黄花蒿(图1b,d)。

[0018] 图2为4种Art v 3同种型过敏原的特异性单抗与6种我国常见的蒿属花粉提取物和欧洲北艾的ELISA结合实验图。

[0019] 图3为6种蒿的Art v 3类型过敏原的氨基酸序列比较。

[0020] 图4为以A2-B8作为特异性亲和抗体,从6种蒿花粉提取物种免疫亲和纯化得到的Art v3同种型过敏原的电泳检测图,泳道1-6分别黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、大籽蒿、野艾蒿、细裂叶莲蒿中的Art v 3同种型过敏原。

[0021] 图5为纯化所得目的条带的质谱匹配序列图。

[0022] 图6为以A2-B8作为结合一抗,生物素标记的A9-G10作为检测二抗,5种天然和重组的Art v 3同种型过敏原作为标准品,用双夹心酶联免疫吸附实验所建立的过敏原定量的标准曲线图。

[0023] 图7是以图6所建立的标准曲线计算所得的7种蒿花粉提取物种Art v 3类型过敏原的含量。

## 具体实施方式

[0024] 材料

[0025] 黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、细裂叶莲蒿、大籽蒿:采集自山西省;

[0026] 野艾蒿:采集自浙江省;

[0027] 北艾:购自德国默克公司。

[0028] 实施例1

[0029] 提取黄花蒿和艾蒿花粉中的蛋白。蛋白提取纯化方法:2g花粉溶在35mL PBS (pH 7) 中,在4℃摇床过夜提取,10000g离心20分钟后收集上清,再用0.22μm Millipore膜过滤获得花粉蛋白提取物。BCA法测定提取物种的总蛋白浓度。

[0030] 以100μg的黄花蒿和艾蒿花粉提取物各免疫5只小鼠,每隔7-14日即注射50μg蛋白提取物,共6次,重组的Art v 3和蒿花粉蛋白提取物共同用于ELISA和Western-blot筛选特异性单抗,得到的单克隆细胞株制备腹水,检测后生产单抗用Protein G层析柱纯化,共得到4种Art v 3过敏原的特异性单抗,如图1所示。4种单抗都来源于杭州艾乐吉生物科技有限公司,其中A11-B2单抗的货号为MA-A11B2,A9-G10单抗的货号为MA-A9G10,5-E10单抗的货号为MA-5E10,A2-B8单抗的货号为MA-A2B8。

[0031] 用ELISA法确定单抗的种类和亚型,将0.5μg蒿花粉提取物包被于酶标板上,分别加入4种单抗,再分别加入羊抗鼠IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG2c,IgG3,IgM,IgE,IgA(1:5000稀释,购自北京博奥龙免疫技术有限公司,货号BF06004)作为二抗,HRP标记的兔抗羊IgG作为三抗(1:5000稀释),TMB显色,测量450/620nm出的吸光值,以此确定各单抗的亚型。效价检测是用0.5μg的蒿花粉提取物包板,分别加入依次稀释了200,1000,5000,10000,20000,60000,240000倍的4种单抗,HRP标记的羊抗鼠IgG作为二抗,以此来确定各单抗的效价。检测结果如表1所示,4种抗体均为IgG1亚型。

[0032] 表1四种Art v 3特异性单抗的亚型和效价

免疫原 Immunogen	抗体编号 Antibody No.	抗体亚型 Antibody subtype	抗体浓度(mg/ml) Concentration (mg/ml)	效价 Titer
[0033] 艾蒿	A11-B2	IgG1 $\kappa$ chain	2.26	1 : 240000
	A9-G10	IgG1 $\kappa$ chain	2.88	1 : 240000
黄花蒿	5-E10	IgG1 $\kappa$ chain	3.64	1 : 240000
	A2-B8	IgG1 $\kappa$ chain	1.38	1 : 240000

## [0034] 实施例2

[0035] 提取6种我国常见蒿(黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、裂叶莲蒿、野艾蒿、大籽蒿)以及欧洲北艾花粉中的蛋白,提取方法同实施例1。分别取0.5 $\mu$ g的7种蒿花粉提取物包板,然后加入0.03 $\mu$ g的4种Art v 3单抗,HRP标记的羊抗鼠IgG(1:5000稀释)作为二抗,TMB显色,记录450/620nm处的吸光值,比较各个抗体与不同蒿花粉提取物的亲和力,如图2所示,A11-B2与7种蒿花粉提取物的结合值均较低,其余3种单抗与除大籽蒿之外的6种蒿花粉提取物都有较高的亲和力,其中A9-G10和A2-B8的亲和力要高于5-E10,对大籽蒿来说,A9-G10的亲和力远高于其它3种单抗。

## [0036] 实施例3

[0037] 提取6种我国常见蒿花粉的mRNA,逆转录为cDNA,根据IUIS数据库中已有的Art v 3序列,设计Art v 3类型过敏原的特异性引物,(上游:ATGGCAATGAAAATGATGAA;下游:CTAGCATAAAGYAYTTCAC),茵陈蒿和大籽蒿的引物需要根据转录组测序结果进行调整,茵陈蒿引物:上游ATGGCAATRAAAAATGATGAAGG,下游:TTCCATGTATTCCAGCATAAA;大籽蒿引物:上游:ATGGCAATGAAAATGATGAAG,下游:TCATTTACCTTGTTGCAATC,从而获得6种蒿的Art v 3类型过敏原的氨基酸序列,如图3所示,6种蒿花粉中的Art v 3类型过敏原各有两个不同的亚型。按照IUIS过敏原命名规则对各亚型进行命名,如表2和图3所示。

## [0038] 表2七种蒿花粉中Art v 3类型过敏原的GeneBank号

物种	过敏原名称	核苷酸序列 GenBank 号	蛋白序列 GenBank 号
黄花蒿	Art an 3.0101	KR996738	ANC85017
	Art an 3.0102	KR996740	ANC85018
艾蒿	Art ar 3.0101	KR996741	ANC85019
	Art ar 3.0102	KR996742	ANC85020
茵陈蒿	Art ca 3.0101	KR996743	ANC85021
	Art ca 3.0102	MN650088	QIN55516
[0039] 细裂叶莲蒿	Art gm 3.0101	KR996744	ANC85022
	Art gm 3.0102	KR996745	ANC85022
野艾蒿	Art la 3.0101	KR996746	ANC85024
	Art la 3.0102	KR996747	ANC85025
大籽蒿	Art si 3.0101	KR996748	ANC85026
	Art si 3.0102	KR996749	ANC85027
北艾	Art v 3.0202	EU564846	ACE07187
	Art v 3.0301	EU564847	ACE07188

## [0040] 实施例4

[0041] 提取6种我国常见蒿(黄花蒿、艾蒿、茵陈蒿、裂叶莲蒿、野艾蒿、大籽蒿)花粉中的蛋白,提取方法同实施例1,放入冷冻干燥机中过夜干燥,然后用0.1M Tris-HCl溶解。将实施例1中所得到的单抗A2-B8(10mg)透析至偶联缓冲液中(0.1M NaHCO<sub>3</sub>,0.5M NaCl,pH=8.3),取1ml CNBr-activated Sepharose 4Fast Flow,加入4倍体积的1mM预冷的HCl,搅拌并除去液体,加入透析至PBS中的A2-B8抗体,4℃过夜偶联,用至少5倍体积的偶联缓冲液清洗2-3次,加入10ml的0.1M Tris-HCl缓冲液室温封闭2h,用3倍体积的A液(0.1M NaAC,0.5M NaCl,pH=4.0)和3倍体积的B液(0.1M Tris-HCl,0.5M NaCl,pH=8.0)交替清洗介质3-4次,再用0.1M Tris-HCl清洗两次后,加入花粉提取物,室温孵育30min,然后用0.1M的Tris-HCl清洗4次,每次5ml,再用0.1M甘氨酸溶液洗脱6次,每次5ml,洗脱液干燥后,用PBS缓冲液溶解,电泳检测,并将目的条带割下,进行质谱鉴定。纯化所得到的6种Art v 3同种型过敏原如图4所示,其纯度在90%以上,目的条带经质谱后证实为Art v 3类型过敏原,将肽段匹配到实施例3中所得到的氨基酸序列上,其质谱匹配序列如图5所示。

[0042] 实施例5

[0043] 根据实施例2所得结果,A11-B2与7种蒿的结合能力都较低,因此选择其余3种抗体作为双夹心ELISA定量的备选抗体,两两配对,选出最合适的一对。首先用EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation(Thermo Fisher)试剂盒为3种单抗标记生物素作为二抗,取2ml单抗透析至PBS缓冲液中,加入适量现配10mM生物素溶液,混匀后冰浴2h,用脱盐柱去除过量未连接的生物素。分别将3种单抗(A2-B8、A9-G10、5-E10)稀释为5μg/ml,依次稀释10倍,共7各浓度梯度,包被于酶标板上作为一抗rArt v 3.0201(5μg/孔)作为抗原,生物素标记的3种单抗(1:10000)稀释作为二抗,HRP标记的链霉亲和素为三抗(1:5000)稀释,TMB显色并记录OD值。结果如表3所示,A9-G10作为一抗,生物素标记的5-E10作为二抗时,结合值最高,但由实施例2的结果可知,5-E10对7种蒿花粉的结合值过低,尤其是与大籽蒿,因此不宜作为定量抗体,综合之下,选择A2-B8和A9-G10作为定量抗体,其中A2-B8作为一抗,生物素标记的A9-G10作为二抗。

[0044] 表3单抗配对结果

	一抗	A9-G10			5-E10			A2-B8		
	二抗	A9-G10	5-E10	A2-B8	A9-G10	5-E10	A2-B8	A9-G10	5-E10	A2-B8
[0045] 一抗浓度 (μg/ml)	5	0.0895	2.7421	2.4224	2.2762	0.0562	0.0539	2.0060	0.0489	0.0483
	0.5	0.0514	1.3368	0.2923	0.4536	0.0517	0.0524	0.0526	0.0481	0.0489
	0.05	0.0511	0.1433	0.0601	0.0715	0.0608	0.0475	0.0485	0.0449	0.0438
	0.005	0.0512	0.0549	0.0570	0.0553	0.0472	0.0490	0.1745	0.0481	0.0477
	0.0005	0.0465	0.0468	0.0514	0.0475	0.0490	0.0454	0.0529	0.0642	0.0457
	0.00005	0.0518	0.0537	0.0534	0.0581	0.0723	0.0636	0.0544	0.0509	0.0528
	0.000005	0.0456	0.0552	0.0547	0.3299	0.3350	0.0520	0.0468	0.0459	0.0449

[0046] 实施例6

[0047] 根据实施例5所得结果,选用A2-B8和A9-G10两个对6种蒿花粉提取物均有较高亲和力的单抗配对,进行双夹心ELISA定量。

[0048] A2-B8和A9-G10两个单抗均在杭州艾乐吉生物科技有限公司有销售,A2-B8单抗,

货号MA-A2B8;A9-G10单抗,货号MA-A9G10。

[0049] 根据浓度配对结果,确定一抗和二抗的最佳浓度均为 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ,取A2-B8稀释至 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 包板, $4^{\circ}\text{C}$ 过夜,用5%脱脂奶粉, $37^{\circ}\text{C}$ 封闭1h,然后将标准品(用单克隆抗体(A2-B8)纯化6种花粉提取物中的Art v 3类型过敏原,通过电泳(SDS-PAGE)和质谱(LC-MS/MS)对纯化产物进行鉴定,以BCA法测定纯化出的过敏原浓度,并将其用作标准品对不同蒿花粉提取物中的Art v 3类型过敏原进行定量。)按照 $256-0\text{ng}/\text{ml}$ 依次2倍稀释,共15个梯度,加入 $100\mu\text{l}$ , $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,然后加入 $100\mu\text{l}$ 的 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 二抗, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h后,加入 $100\mu\text{l}$  HRP标记的羊抗鼠IgG(1:5000稀释) $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,然后TMB避光显色15min后,加入2M HCl终止反应,测定450/620nm处的吸光值,用GraphPad绘制标准曲线图(图6),标曲每孔重复三次,绘制标准曲线所用数据如表4。

[0050] 表4五种不同标准品双夹心ELISA建立标曲

[0051]

标准品 (ng/ml)	256	128	64	32	16	8	4	2
rArt v 3.0201	2.13	2.0538	1.78	1.4561	0.8685	0.5086	0.3494	0.1956
	2.2401	2.0852	1.892	1.5	0.9686	0.4898	0.4221	0.1517
	2.215	2.12	1.7809	1.4143	0.98	0.5399	0.343	0.2657
nArt an 3	2.2281	2.1403	2.0475	1.575	1.1606	0.5522	0.2707	0.1182
	2.1458	2.1353	1.835	1.3598	0.9034	0.4432	0.2335	0.1276
	2.0983	2.0726	1.7417	1.3482	0.8444	0.3833	0.2248	0.0985
nArt ar 3	1.4318	1.28	1.158	0.7885	0.3461	0.1397	0.083	0.0668
	1.3201	1.4296	1.2012	0.68	0.3169	0.1374	0.065	0.0658
	1.4628	1.28	1.1084	0.6787	0.3042	0.1212	0.0776	0.0688
nArt ca 3	2.2034	1.7897	1.5742	1.0364	0.4059	0.1542	0.0992	0.0596
	1.9218	1.798	1.4496	0.8818	0.34	0.1327	0.0843	0.0614
	1.8923	1.6773	1.2657	0.8907	0.3479	0.1521	0.1093	0.058
nArt si 3	1.2396	0.7835	0.4578	0.2858	0.1839	0.139	0.1081	0.0845
	1.3301	0.6863	0.4739	0.2941	0.1857	0.1133	0.1038	0.0775
	1.1494	0.7915	0.4418	0.225	0.1875	0.1245	0.105	0.0815
标准品 (ng/ml)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0	
rArt v 3.0201	0.1747	0.1371	0.0952	0.0831	0.0445	0.0563	0.0308	
	0.2186	0.0884	0.1189	0.0594	0.0416	0.0549	0.0439	
	0.2293	0.1423	0.0985	0.0586	0.0371	0.0496	0.0296	
nArt an 3	0.1289	0.0965	0.0396	0.0285	0.0255	0.0187	0.0194	
	0.1511	0.0682	0.0418	0.0318	0.0263	0.0206	0.0187	
	0.1255	0.0854	0.0378	0.0251	0.0235	0.02	0.0248	
nArt ar 3	0.062	0.0624	0.0346	0.0305	0.0595	0.0373	0.0652	
	0.0642	0.0521	0.0321	0.0288	0.0476	0.0359	0.0731	
	0.0599	0.0408	0.0438	0.0368	0.0474	0.0469	0.0534	
nArt ca 3	0.1193	0.0873	0.071	0.0524	0.0515	0.0471	0.0489	
	0.1066	0.0786	0.0684	0.0573	0.0578	0.0463	0.0455	
	0.1084	0.0669	0.0743	0.0575	0.0541	0.0464	0.0395	
nArt si 3	0.0961	0.0751	0.073	0.0638	0.062	0.0585	0.0721	
	0.0903	0.0837	0.0679	0.0687	0.0604	0.0558	0.0843	
	0.0961	0.0665	0.0648	0.073	0.0591	0.0463	0.0641	

[0052] 计算该标曲的最低检限阈值(LDL):空白对照OD值平均值加上其10倍标准差对应的标准曲线上的最小浓度值。最佳浓度测定范围即为标曲上的线性区域所对应的浓度范

围。5种标准品的最低检限阈值和最佳浓度测定范围如表5所示。

[0053] 表5五种标准品对应的标准曲线的最低检限阈值和最佳浓度测定范围

标准品	最低检限阈值(ng/ml)	最佳浓度测定范围 (ng/ml)
rArt v 3.0201	0.25	2-128
nArt an 3	0.25	2-128
nArt ar 3	2	4-128
nArt ca 3	0.5	4-128
nArt si 3	1	8-256

[0054] 实施例7

[0055] 以实施例6中所建立的标准曲线为基础,测量6种不同蒿花粉提取物中的Art v 3同种型过敏原含量。首先对各个花粉提取物的测试浓度进行筛选,分别将各花粉提取物梯度稀释,按照实施例6中所建立的双夹心ELISA的方法进行检测,选择OD450值处于最佳拟合区间的稀释值进行样品稀释(如表6),艾蒿、野艾蒿、北艾的检测浓度设定为40ng/ml,黄花蒿和细裂叶莲蒿设定为600ng/ml,茵陈蒿为2 $\mu$ g/ml,大籽蒿为20 $\mu$ g/ml,测定花粉提取物中Art v 3同种型过敏原含量,每个样品重复3次。

[0056] 表6花粉提取物检测浓度筛选

$\mu$ g/ml	茵陈蒿	大籽蒿	艾蒿	黄花蒿	野艾蒿	细裂叶莲蒿	北艾
20	1.211	0.2357	1.9171	0.8961	2.0831	1.3999	1.9996
10	1.0915	0.185	1.8811	0.8081	1.9695	1.3423	1.9702
5	1.125	0.1555	1.9011	0.7924	1.9083	1.2335	1.9193
2.5	0.9583	0.0979	1.8066	0.8308	1.9055	1.1396	1.8404
1.25	0.8124	0.0553	1.7823	0.7781	1.7946	0.9832	1.7948
0.625	0.6807	0.0456	1.8192	0.7262	1.6394	0.8137	1.7387
0.3125	0.5592	0.0226	1.6562	0.5037	1.2712	0.49	1.4053
0.15625	0.4517	0.0227	1.5149	0.3807	0.9133	0.2704	1.1411
0.078125	0.3081	0.0199	1.2696	0.24	0.5303	0.142	0.686
0.039063	0.2138	0.0185	1.0482	0.1405	0.3075	0.0869	0.3972
0.019531	0.1296	0.021	0.7804	0.0785	0.1981	0.0523	0.2642
BSA	0.0143	0.0285	0.0294	0.0249	0.0179	0.0155	0.0131

[0057] 根据7种蒿的Art v 3蛋白序列,选择用rArt v 3.0201标准品对北艾花粉中Art v 3的进行定量,nArt an 3标准品用于黄花蒿和细裂叶莲蒿的定量,nArt ar 3用于艾蒿和野艾蒿的定量,nArt ca 3用于茵陈蒿的定量,nArt si 3用于大籽蒿的定量,测定方法同实施例6最终测得各花粉提取物中Art v 3同种型过敏原在花粉总蛋白中的含量如图7所示,艾蒿花粉提取物中含量最高(10.5%),大籽蒿中含量最低(0.3%)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江大学
- [0003] <120> 一种定量蒿属植物花粉中nsLTP过敏原的方法
- [0004] <160> 6
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] atggcaatga aatgatgaa 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 19
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] ctagcataaa gyayttcac 19
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 22
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] atggcaatra aatgatgaa gg 22
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 21
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] ttccatgtat tccagcataa a 21
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 21
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] atggcaatga aatgatgaa g 21
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 21
- [0038] <212> DNA

- 
- [0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0040] <400> 6  
[0041] tcatttcacc ttgttgcaat c 21

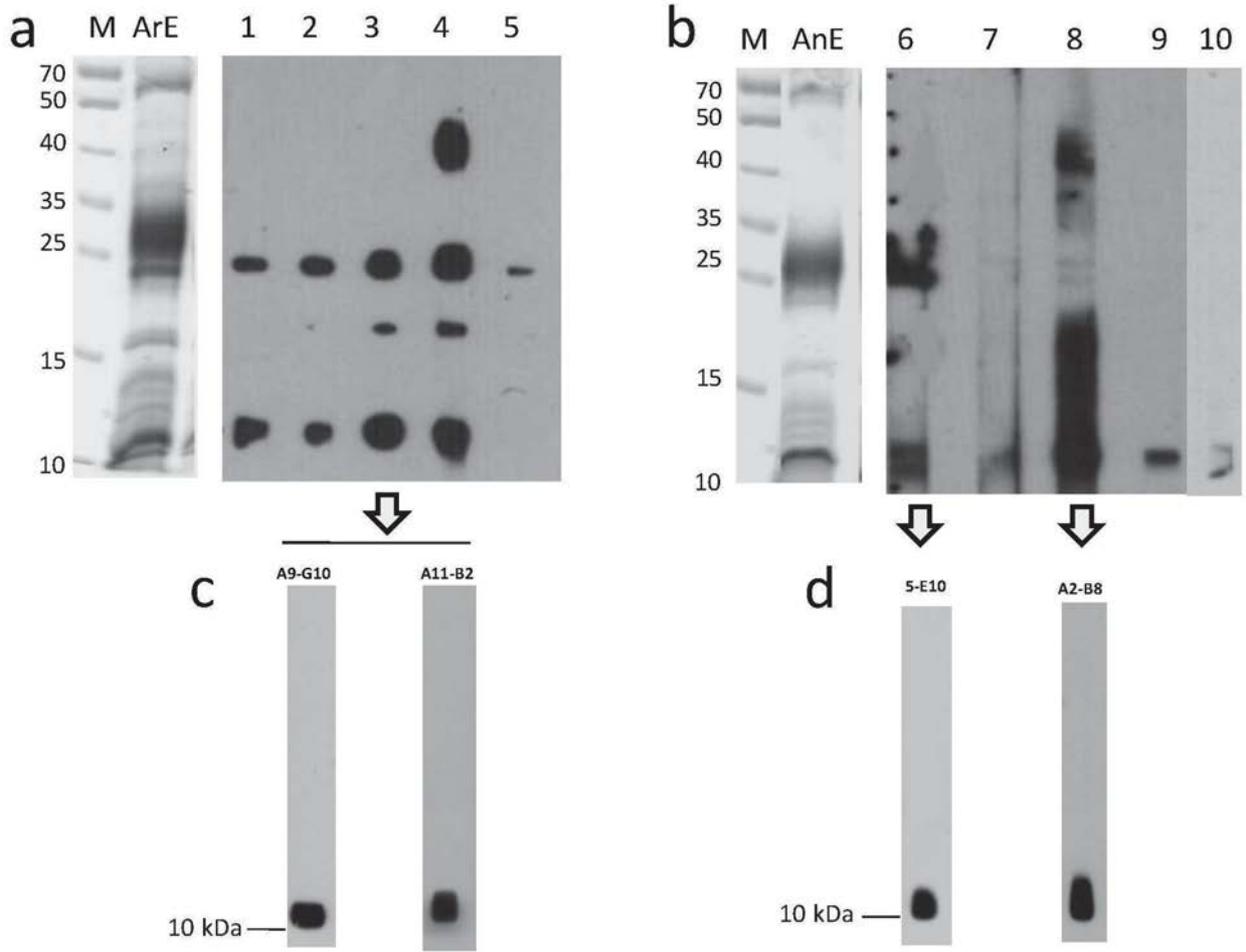


图1

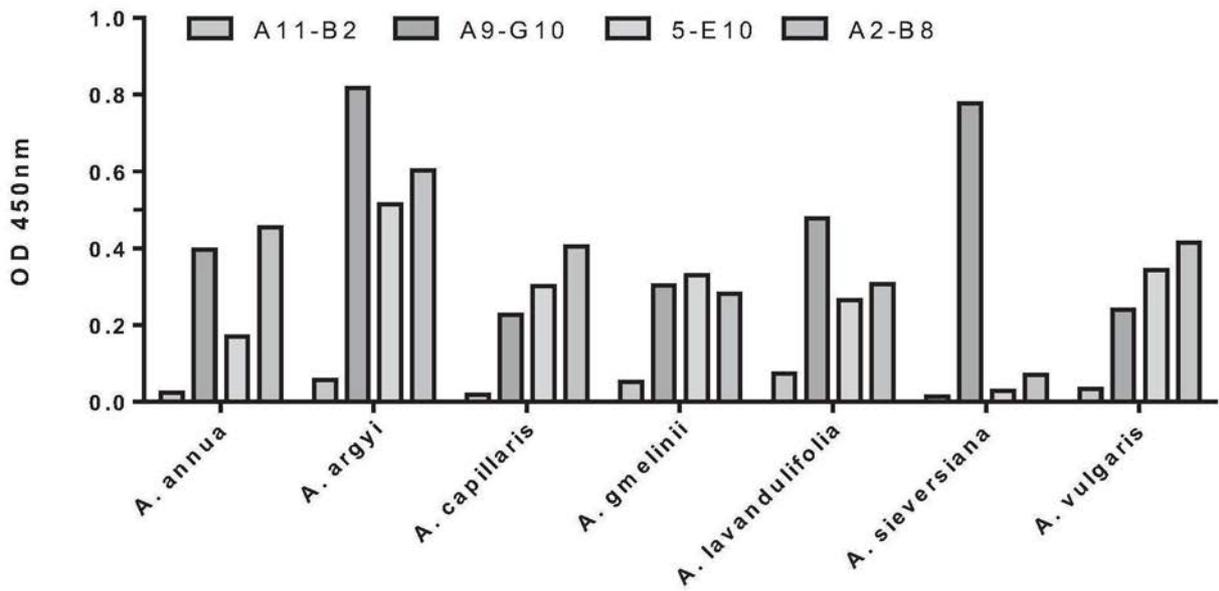


图2

Art v 3.0201	*	20	*	40	*	60	*	80	*	
Art v 3.0301	:	~LKCDVSNKISACLSYLKOGGEVPA	DCCTGVKGLNDAAKTTPDRQ	TACNCLKTTFKSNKDFKSDFAASL	PSKCGVNI	PKISLE	TD	CNKVK	:	91
Art v 3.0202	:	A.T.....	T.P.....	K.....	T.....	AS.....	VP.....	L.L.....	L.....	92
Art ar 3.0101	:	-T.....	TP.N.....	S.....	L.....	L.....	L.....	L.....	L.....	91
Art la 3.0101	:	-T.....	TP.N.....	S.....	L.....	L.....	L.....	L.....	L.....	91
Art la 3.0102	:	A.T.....	T.P.....	K.....	T.....	AS.....	VP.....	L.L.....	L.....	92
Art ar 3.0102	:	-T.....	TP.N.....	S.....	L.....	L.....	L.....	L.....	L.....	91
Art si 3.0102	:	-T.....	TP.N.....	S.....	L.....	L.....	L.....	L.....	L.....	91
Art si 3.0101	:	-T.....	TP.N.....	S.....	L.....	L.....	L.....	L.....	L.....	91
Art gm 3.0101	:	A.T.....	P.T.F.....	N.A.....	T.....	NS.T.....	Y.VP.....	L.M.....	L.....	92
Art gm 3.0102	:	A.T.....	P.T.F.....	N.V.....	S.....	L.....	N.VV.....	L.....	L.....	92
Art an 3.0101	:	A.T.....	LP.T.F.....	S.....	A.....	N.VV.....	L.....	L.....	L.....	92
Art ca 3.0101	:	A.T.....	LP.T.F.....	S.....	A.....	N.VV.....	L.....	L.....	L.....	92
Art an 3.0102	:	A.T.N.TK.....	P.T.F.EK.....	V.....	A.....	S.SNN.EEN.V.....	L.....	L.....	L.....	92
Art ca 3.0102	:	A.T.....	TP.....	F.....	G.....	K.....	L.....	N.VV.....	T.....	92

图3

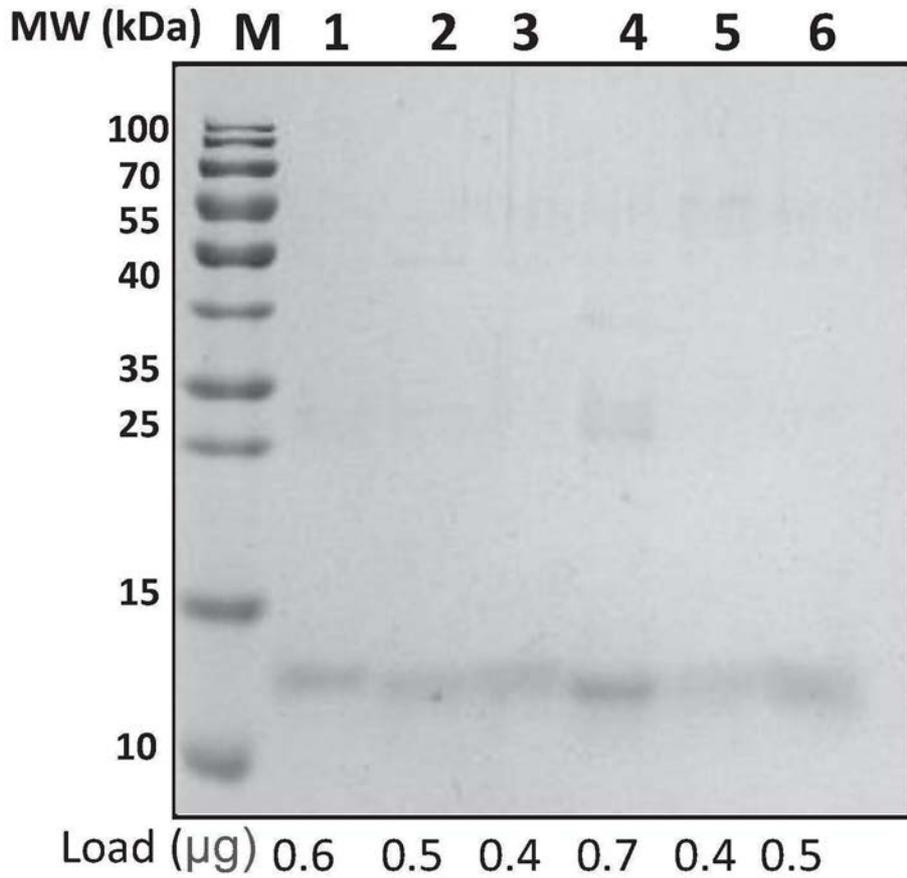


图4

```

>Art an 3.0101
ALTCSDVSNKILPCTSFLKQGGEVSADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQAACNCLKTTFKSNKDFKSDNAVVLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art an 3.0201
ALTCNDVTKKISPCTSFLKQGGEVVDCCCTGVKGLNDAAKTTPDRQAACNCLKTSFKSSNFKEENA AVLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art ar 3.0101
LKCSVSNKISACLSYLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQTACNCLKTTFKSNKDFKSDFAASLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art ar 3.0102
ALTCSDVSTKISPCLSYLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQTACNCLKTSFKSNKDLKSDFAVPLPSKCGLNLPYKLSLETDCNKVK
>Art ca 3.0101
ALTCSDVSNKILPCTSFLKQGGEVSADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQAACNCLKTTFKSNKDFKSDNAVVLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art ca 3.0102
ALTCSDVSNKITPCLSFLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQKACNCLKTTFKSNKDLKSDNAVVLPSKCGVNIPYKISLETDCNTVK
>Art gm 3.0101
ALTCSDVSNKISPCTSFLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQTACNCLKTSFKSNKDFKSDNA AVLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art gm 3.0102
ALTCSDVSNKISPCLSFLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQTACNCLKTSFKSNKDLKSDNAVVLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art la 3.0101
ALTCSDVSTKISPCLSYLKKQGGEVPADCCTGVKGLNDATKTPDRQTACNCLKASFKSNKDLKSDFAVPLPSKCGLNLPYKLSLETDCNKVK
>Art la 3.0102
LKCSVSNKISACLSYLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQTACNCLKTTFKSNKDFKSDFAASLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art si 3.0101
LTCSVSNKITPCLNYLKQGGEVPADCCTGVKGLNDAAKTTPDRQTACNCLKTSFKSNKDLKSDFAASLPSKCGVNIPYKISLETDCNKVK
>Art si 3.0102
ALTCSDVSNKISPCLNYLKQGGEVPANCCAGVKGLNDAAKTTPDRQTACTCLKNSFKTNKDLKSDYAVPLPSKCGVTIPYKLSMETDCNKVK
    
```

图5

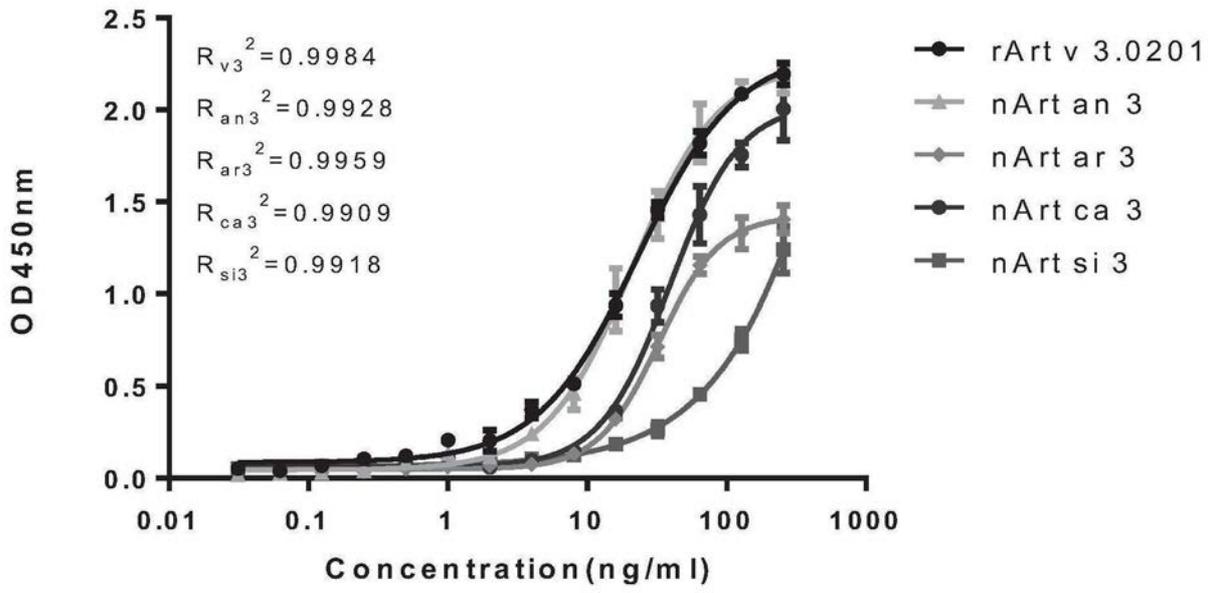


图6

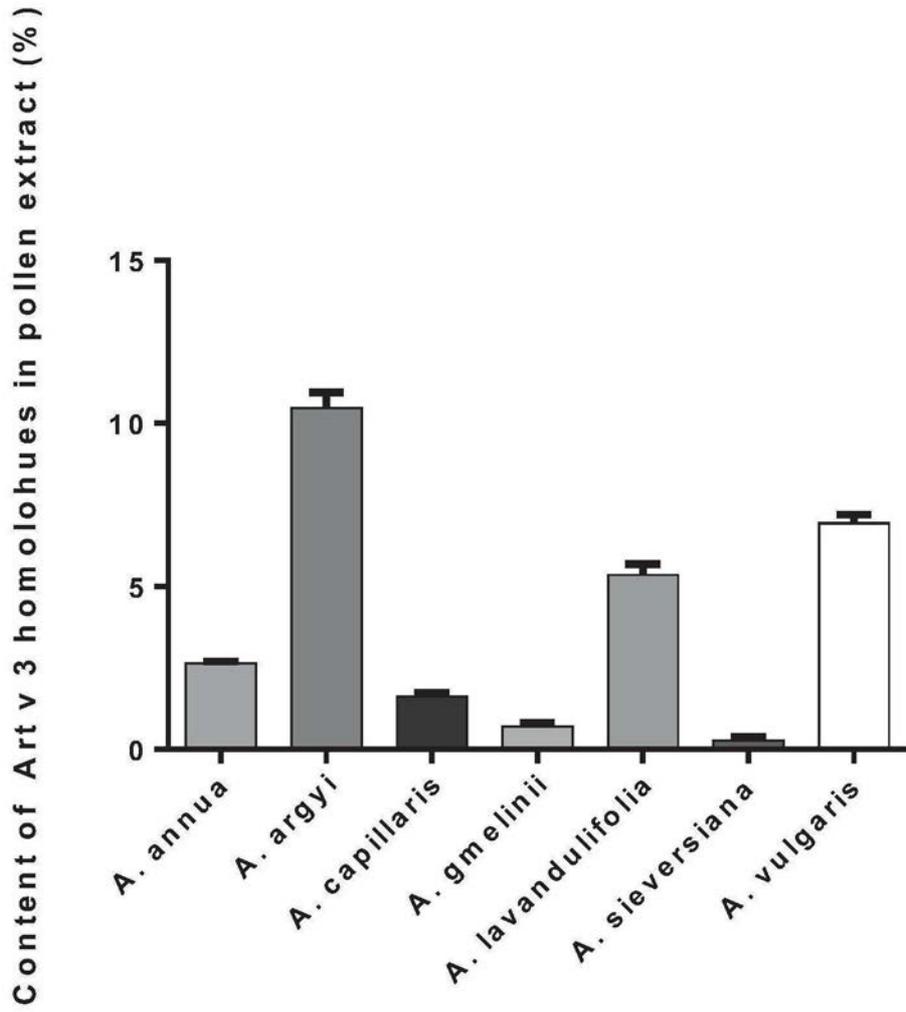


图7