



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102721804 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201210171166. 0

(22) 申请日 2012. 05. 29

(71) 申请人 西安金磁纳米生物技术有限公司

地址 710077 陕西省西安市高新区丈八五路
2号现代企业中心东区3栋4层10402A

(72) 发明人 张秦鲁 成晓 崔亚丽

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限
公司 61211

代理人 陈广民

(51) Int. Cl.

G01N 33/551 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法

(57) 摘要

本发明提供了一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法, 实现定量检测人血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中的抗原 / 抗体的含量, 以解决现有技术成本较高、步骤繁琐、反应可控性差、不具有通用性等问题。该方法主要包括以下步骤: 1) 用金磁微粒制备免疫磁珠; 2) 用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记抗原 / 抗体; 3) 定量测定抗原 / 抗体标准曲线的建立; 4) 检测待测样品; 采用一种新型电化学发光免疫分析技术, 具有操作简便, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记抗体的过程不影响抗体效价, 标记成本低, 具有通用性等优点。

1. 一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法,包括以下步骤:

1) 用金磁微粒制备免疫磁珠

采用偶联缓冲液稀释与待测对象相应的捕获抗体/抗原,得到捕获抗体/抗原溶液;移取金磁微粒于离心管中,加入偶联缓冲液轻摇混匀,磁性分离弃上清;取所述抗体/抗原溶液加入到所述装有金磁微粒的离心管中,轻摇混匀,将离心管固定于恒温摇床中振荡反应,待反应完毕后磁性分离弃上清,将清洗缓冲液加入到该离心管中轻摇混匀,磁性分离弃上清;在该离心管中加入封闭剂,并将其置于恒温摇床中振荡反应,待反应结束后磁性分离弃上清;最后加入保存缓冲液,轻摇混匀,制得免疫磁珠,保存备用;

2) 用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记抗体/抗原

另取对应于所述捕获抗体/抗原的检测抗体/抗原,用标记缓冲液进行充分透析;取 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 并将其溶解于 DMSO 中;调整检测抗体/抗原与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的摩尔比,使其达到最佳标记比例;将两者混合加入离心管中,在恒温摇床中避光反应;待反应结束向上述离心管中加入 100 μL 、2M 的甘氨酸溶液,继续避光反应 10min 以终止反应;将离心管中的反应物用保存缓冲液避光透析;透析后即得到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体/抗原,保存备用;

3) 定量测定抗原/抗体的标准曲线的建立

取多支反应管,分别向每支反应管中加入定量的所述免疫磁珠、不同浓度的抗原/抗体标准品、所述 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体/抗原,将其置于恒温摇床中反应,形成磁性免疫复合物:

免疫磁珠-抗原- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体免疫复合物;

免疫磁珠-抗体- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗原免疫复合物;

免疫磁珠-抗原-抗体- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的二抗免疫复合物;

清洗并重悬免疫复合物,再将其加入到电化学发光免疫分析仪的检测室,同时引入含 TPA 的 ECL 缓冲液,然后启动电化学发光反应,记录发光值,制作标准曲线;

4) 检测待测样品

取反应管,加入定量的所述免疫磁珠、待测样品、所述 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体/抗原,将其置于恒温摇床中反应,形成所述免疫复合物;清洗并重悬该免疫复合物,然后再将其加入到电化学发光免疫分析仪的检测室,同时引入含 TPA 的 ECL 缓冲液,启动电化学发光反应;记录发光值,通过所述标准曲线计算待测样品中抗原/抗体的浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的电化学发光免疫分析方法,其特征在于:

步骤 2) 中的标记缓冲液为 0.005 ~ 0.1M, pH 8 ~ 10 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液;

步骤 2) 中所述检测抗体/抗原与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的摩尔比 1:10 ~ 1:100;待标记的检测抗体/抗原的浓度应调至 0.1 ~ 10mg/mL;

步骤 3) 中所述 ECL 缓冲液为 0.005 ~ 0.1M, pH 7 ~ 9 的 PB 缓冲液,含 0.05% ~ 0.1%TritonX-100,0.05% ~ 0.1%Tween20,0.1% NaN_3 ,100mM TPA。

3. 根据权利要求 2 所述的电化学发光免疫分析方法,其特征在于:

步骤 1) 中所述偶联缓冲液为 0.005 ~ 0.1M, pH 6 ~ 8 的 Tris-HCl 缓冲液;封闭剂的配方为:1% ~ 10%BSA,1% ~ 5% 小牛血清,0.1% ~ 2%PEG20000。

4. 根据权利要求 2 所述的电化学发光免疫分析方法,其特征在于:步骤 1) 和 2) 中所

述保存缓冲液为 0.005 ~ 0.1M, pH 6 ~ 8 的 PB 缓冲液, 含 0.1% ~ 1%NaN₃。

5. 根据权利要求 2 所述的电化学发光免疫分析方法, 其特征在于: 步骤 1) 和 2) 恒温摇床的转数为 100 ~ 180rpm, 温度为 20 ~ 37℃。

6. 根据权利要求 2 所述的电化学发光免疫分析方法, 其特征在于: 步骤 1) 和 3) 中所述清洗缓冲液为 0.005 ~ 0.1M, pH 6 ~ 8 的 PBST。

一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及电化学发光免疫分析技术。

背景技术

[0002] 人体中某种抗原 / 抗体的浓度可能与其的健康状况、生理机能、生理周期等有直接的关系,所以定量检测人体中抗原 / 抗体的浓度对人体意义重大。如人体血清中 PSA 的浓度在前列腺癌的诊断、预后判断和疗效检测等方面具有重要意义。目前人体血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中的抗原 / 抗体的检测技术主要有:放射免疫分析技术 (Radioimmunoassay, RIA)、酶联免疫分析技术 (Enzyme linked Immunosorbent Assay, ELISA)、荧光免疫分析 (Fluorescence Immunoassay, FIA)、化学发光免疫分析技术 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA)、免疫层析技术 (Lateral Flow Immunoassay, LFIA) 等方法,但这些方法都有各自的优点与不足,而电化学发光免疫分析 (Electrochemiluminescence Immunoassay, ECLIA) 是化学发光免疫分析的一种衍生技术,是目前最先进的标记免疫分析技术,它继承了化学发光免疫分析技术的全部优点,弥补了化学发光免疫分析技术的缺陷,拓展了化学发光免疫分析技术的应用空间,并以其独特的优势备受广大科研工作者、医务工作者和患者的青睐。

[0003] 电化学发光免疫分析包括两个部分,分别为免疫反应系统和电化学分析系统。免疫反应系统是用电化学发光标记物标记抗原或抗体,然后经过免疫反应和一系列操作步骤形成免疫复合物待检的过程;电化学分析系统是免疫复合物上的电化学发光物质在工作电极表面发生电化学发光,利用发光测量仪器检测发光强度,从而对抗原或抗体进行检测的过程。

[0004] 与其他技术相比电化学发光免疫分析技术主要有如下优势:1) 灵敏度高,线性范围宽,检测灵敏度和线性范围可达到或超过放射免疫分析;2) 试剂稳定,无毒无放射性危害;3) 稳定性好,自动化程度高;4) 检测速度快;5) 应用范围广。目前电化学发光免疫分析技术已被广泛用于激素、肿瘤标志物、乙肝各项指标及其他物质如维生素、叶酸、DNA、RNA、免疫球蛋白等的检测。但是,传统电化学发光免疫分析方法中涉及抗原 / 抗体的生物素化、用功能化基团修饰磁微球等过程,步骤繁琐,成本较高。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法,实现定量检测人血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中的抗原 / 抗体的含量,以解决现有技术成本较高、步骤繁琐、反应可控性差、不具有通用性等问题。

[0006] 为实现以上发明目的,本发明给出的基础技术方案如下:

[0007] 1、一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 用金磁微粒制备免疫磁珠

[0009] 采用偶联缓冲液稀释与待测对象相应的捕获抗体 / 抗原,得到捕获抗体 / 抗原溶

液；移取金磁微粒（尤其以平均粒径小于 $5\ \mu\text{m}$ ，饱和磁化强度大于 $40\text{A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ 的金磁微粒为佳）于离心管中，加入偶联缓冲液轻摇混匀，磁性分离弃上清；取所述捕获抗体 / 抗原溶液加入装有所述金磁微粒的离心管中，轻摇混匀，将离心管固定于恒温摇床反应，待反应完毕磁性分离弃上清，将清洗缓冲液加入该离心管中轻摇混匀，磁性分离弃上清；在该离心管中加入封闭剂，并将其置于恒温摇床中振荡反应，反应结束后磁性分离弃上清；最后加入保存缓冲液，轻摇混匀，制得免疫磁珠。

[0010] 2) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记检测抗体 / 抗原

[0011] 另取对应于所述捕获抗体 / 抗原的检测抗体 / 抗原，用标记缓冲液进行充分透析；取 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS ester}$ 将其溶解于 DMSO（二甲亚砜）中；调整检测抗体 / 抗原与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS ester}$ 的摩尔比，使其达到最佳标记比例；将两者混合加入离心管中，在恒温振荡器里避光反应；待反应结束向上述离心管中加入 $100\ \mu\text{L}$ 、 2M 的甘氨酸溶液，继续避光反应 10min 以终止反应；将离心管中的反应物用保存缓冲液避光透析；透析后即得到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体 / 抗原，保存备用。

[0012] 3) 定量测定抗原 / 抗体标准曲线的建立

[0013] 取多支反应管，分别向每支反应管中加入定量的所述免疫磁珠、不同浓度的抗原 / 抗体标准样品、所述 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体 / 抗原，将其置于恒温摇床中反应，形成磁性免疫复合物：

[0014] 免疫磁珠 - 抗原 - $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的检测抗体免疫复合物；

[0015] 免疫磁珠 - 抗体 - $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗原免疫复合物；

[0016] 免疫磁珠 - 抗原 - 检测抗体 - $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的二抗免疫复合物；

[0017] 清洗并重悬免疫复合物，然后再将其吸入电化学发光免疫分析仪的检测室，同时引入含 TPA 的 ECL 缓冲液；启动电化学发光反应，记录发光值，制作标准曲线。

[0018] 4) 检测待测样品

[0019] 取反应管，加入定量的所述免疫磁珠、待测样品、所述 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体 / 抗原，将其置于恒温摇床中反应，形成所述复合物；清洗并重悬该夹心复合物，然后再将其吸入电化学发光免疫分析仪的检测室，同时引入含 TPA 的 ECL 缓冲液。

[0020] 启动电化学发光反应，记录发光值，通过所述标准曲线计算得到待测样品中抗原 / 抗体的浓度。

[0021] 上述步骤 2) 中的标记缓冲液优选 $0.005\sim 0.1\text{M}$ ， $\text{pH}\ 8\sim 10$ 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液；步骤 2) 中所述检测抗体 / 抗原与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS ester}$ 的分子数比 $1:10\sim 1:100$ ；待标记的检测抗体 / 抗原的浓度应调至 $0.1\sim 10\text{mg/mL}$ ；步骤 3) 中所述 ECL 缓冲液优选 $0.005\sim 0.1\text{M}$ ， $\text{pH}\ 7\sim 9$ 的 PB 缓冲液（含 $0.05\%\sim 0.1\%$ TritonX-100， $0.05\%\sim 0.1\%$ Tween20， $0.1\%\text{NaN}_3$ ， 100mM TPA）。

[0022] 上述步骤 1) 中所述偶联缓冲液为 $0.005\sim 0.1\text{M}$ ； $\text{pH}\ 6\sim 8$ 的 Tris-HCl 缓冲液；封闭剂的配方为： $1\%\sim 10\%$ BSA， $1\%\sim 5\%$ 小牛血清， $0.1\%\sim 2\%$ PEG20000。

[0023] 上述步骤 1) 和 2) 中所述保存缓冲液为 $0.005\sim 0.1\text{M}$ ， $\text{pH}\ 6\sim 8$ 的 PB 缓冲液（含 $0.1\%\sim 1\%\text{NaN}_3$ ）。

[0024] 上述步骤 1) 和 2) 中恒温摇床的转数为 180rpm ，温度为 $20\sim 37^\circ\text{C}$ 。

[0025] 上述步骤 1) 和 3) 中所述清洗缓冲液为 $0.005\sim 0.1\text{M}$ ， $\text{pH}\ 6\sim 8$ 的 PBST。

[0026] 本发明的发光检测体系是通过标记在抗原或抗体上的发光物质——三联吡啶钌来实现的。其发光原理为：发光剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和电子供体 TPA 在阳极表面各失去一个电子而发生氧化反应， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 被氧化成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，TPA 被氧化成 $\text{TPA}^{+\circ}$ ； $\text{TPA}^{+\circ}$ 极不稳定可自发失去一个质子形成 TPA° ， TPA° 是一种强还原剂，可将一个电子传递给 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 使其形成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ ，而 TPA 自身被氧化成二丙胺和丙醛； $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 回到基态时可发射出一个波长 620nm 的光子；此过程在电极表面循环往复地进行，产生许多光子，光电倍增管检测光强度，光强度与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度呈线性关系，故可测出待测抗原或抗体的含量。

[0027] 本发明具有以下优点：

[0028] 1、本发明采用一种平均粒径小于 $5\mu\text{m}$ ，饱和磁化强度大于 $40\text{A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ 的金磁微粒做为固相载体制备免疫磁珠，该金磁微粒兼有磁性纳米粒子的超顺磁性及胶体金表面高效偶联生物/药物分子的性能。该金磁微粒表面的胶体金与蛋白质相互作用可把蛋白质吸附到其金表面，二者之间是物理吸附，无共价吸附，故二者的结合不影响蛋白质的活性，如抗体蛋白的 Fc 片段紧紧吸附在金磁微粒表面的胶体金粒子表面，而抗体蛋白的 Fab 片段则突出在外，从而使 Fab 片段更容易与抗原发生反应。

[0029] 2、本发明采用一种新型的用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记抗原/抗体的技术，具有操作简便，标记过程不会影响抗体效价，标记成本低，具有通用性等优点。

[0030] 3、基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法，除具备传统电化学发光免疫分析技术的全部优点外，还避免了传统电化学发光免疫分析方法中生物素化抗原/抗体、用功能化基团修饰磁微粒等过程，降低了成本，简化了实验步骤。

附图说明

[0031] 图 1 是本发明所用的固相载体—金磁微粒的结构示意图；

[0032] 图 2 是本发明用金磁微粒制备免疫磁珠的操作示意图；

[0033] 图 3、图 4、图 5 是本发明所涉及的磁性免疫复合物形成示意图。

具体实施方式

[0034] 以下实施例对本发明的方案以具体实验操作的形式示例，其中的实验条件和设定参数不应视为对本发明基本技术方案的局限。

[0035] 实施例 1：用基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法定量检测人体血清中 PSA 的浓度。

[0036] 1) 用金磁微粒制备免疫磁珠

[0037] 1.1) 用偶联缓冲液将 PSA 单克隆抗体（捕获抗体）配成 $1\text{mg}/\text{mL}$ ，取出一定量抗体溶液于一离心管中，并标记为 pre，留作偶联效率检测用。

[0038] 1.2) 用移液器移取 **GoldMag[®]-AS** 金磁微粒 ($5\text{mg}/\text{mL}$) $200\mu\text{L}$ 于 2mL 离心管中，加入偶联缓冲液 $400\mu\text{L}$ 轻摇混匀，磁性分离 2min，弃上清。

[0039] 1.3) 取 $300\mu\text{L}$ 此种抗体溶液加入上述装有 **GoldMag[®]-AS** 金磁微粒的离心管中，轻摇混匀，将离心管固定于恒温摇床， 37°C 、 180rpm 振荡反应 1h，反应完毕，磁性分离 2min，取上清液于一离心管中，并标记为 post，留作偶联效率检测用。

[0040] 1.4) 将清洗缓冲液 $300\mu\text{L}$ 加入上述的离心管中轻摇混匀，磁性分离，取上清液

于一离心管中,并标记为 wash₁,重复该清洗操作 1 次,取上清液于另一离心管中,并标记为 wash₂,留作偶联效率检测用。

[0041] 1.5) 在上述离心管中加入 1mL 封闭剂,充分混合溶解,置于恒温摇床中 37℃、180rpm 振荡 1h,磁性分离弃上清;

[0042] 1.6) 最后在上述离心管中加入清洗缓冲液 800 μL,轻摇混匀,磁性分离,弃上清,重复该清洗操作 3 次,加入 1mL 保存缓冲液,轻摇混匀,4℃ 保存备用。

[0043] 1.7) 以偶联缓冲液为空白分别测定 pre、post 在 280nm 处的吸光值,以清洗缓冲液为空白,分别测定 wash₁、wash₂ 在 280nm 处的吸光值;并计算抗体在 GoldMag[®]-AS 金磁微粒表面的偶联效率;以偶联效率乘以加入抗体的量,即为偶联在 GoldMag[®]-AS 微米金磁微粒表面抗体的量。

[0044] 2) Ru(bpy)₃²⁺ 标记抗体

[0045] 2.1) 将 PSA 单克隆抗体(检测抗体)用标记缓冲液在 4℃ 进行充分透析。

[0046] 2.2) 待透析完成后,用 lowry 法测定抗体浓度,并调节抗体的浓度至 1mg/mL。

[0047] 2.3) 溶解 Ru(bpy)₃²⁺-NHS ester 到 DMSO 中,使其浓度为 1mg/mL;调节溶液用量使该抗体与 Ru(bpy)₃²⁺-NHS ester 的摩尔比达到 1:50,该比例为 Ru(bpy)₃²⁺ 标记 PSA 抗体的最佳的标记比例。

[0048] 2.4) 将此种抗体与 Ru(bpy)₃²⁺-NHS ester 混合加入离心管中,室温下,180rpm 避光振荡 4 小时。

[0049] 2.5) 用保存缓冲液在 4℃ 下对其避光透析,直至透析液中没有 ECL 信号。

[0050] 2.6) 透析后,用 lowry 法测定抗体浓度;做标记前后效价的比较;最后将标记好的 PSA 单克隆抗体在 4℃ 或 -20℃ 保存备用。

[0051] 3) 标准曲线的建立

[0052] 3.1) 取出上述免疫磁珠,于室温下平衡 10min;

[0053] 3.2) 向各反应管中加入上述金磁微粒 100 μL,然后再向各对应管中分别加入 100 μL 1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 的 PSA 标准品,37℃,180rpm,置于摇床中反应 30min。

[0054] 3.3) 取出各反应管置于磁性分离器上,磁性分离弃上清,用清洗缓冲液清洗 3 次,磁性分离,弃上清。

[0055] 3.4) 向上述各反应管加入 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的 PSA 单克隆抗体 100 μL,空白对照不加,37℃,180rpm,置于摇床中反应 30min。

[0056] 3.5) 取出反应管置于磁性分离器上,磁性分离弃上清,用清洗缓冲液清洗 3 次,磁性分离弃上清,用发光缓冲液重悬。

[0057] 3.6) 将上述夹心复合物吸入流动室,同时引入 ECL 缓冲液启动电化学发光反应,记录发光值。

[0058] 3.7) 以 PSA 浓度为横坐标,发光强度为纵坐标绘制标准曲线。

[0059] 4) 定量检测 PSA 的浓度

[0060] 4.1) 取出上述免疫磁珠,于室温下平衡 10min;

[0061] 4.2) 向反应管中加入上述金磁微粒 100 μL,然后再向其中加入含 PSA 的待测样本 100 μL,37℃,180rpm,置于摇床中反应 30min。

[0062] 4.3) 取出反应管置于磁性分离器上,磁性分离弃上清,用清洗缓冲液清洗 3 次,磁性分离,弃上清。

[0063] 4.4) 向上述各反应管加入 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的 PSA 单克隆抗体 $100\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$, 180rpm , 置于摇床中反应 30min。

[0064] 4.5) 取出反应管置于磁性分离器上,磁性分离弃上清,用清洗缓冲液清洗 3 次,磁性分离弃上清,用发光缓冲液重悬。

[0065] 4.6) 将上述溶液吸入电化学发光免疫分析仪的检测室,同时引入 ECL 缓冲液启动电化学发光反应,记录发光值。

[0066] 4.7) 根据上述标准曲线计算待测样本中 PSA 的浓度。

[0067] 实施例 2 :用基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法定量检测人血清中 AFP 的浓度。

[0068] 除了制备免疫磁珠时用 AFP 抗体(捕获抗体)包被金磁微粒、用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记 AFP 抗体(检测抗体)、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记 AFP 抗体过程中抗体与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的摩尔比以及建立标准曲线过程中所选择的几个 AFP 标准品的浓度之外,其他步骤同实施例 1。

[0069] 实施例 3 :用基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法定量检测人血清中 TSH 的浓度。

[0070] 除了制备免疫磁珠时用 TSH 抗体(捕获抗体)包被金磁微粒、用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记 TSH 抗体(检测抗体)、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记 TSH 抗体过程中抗体与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的摩尔比、以及建立标准曲线过程中选择的几个 TSH 标准品的浓度之外,其他步骤同实施例 1。

[0071] 实施例 4 :用基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法定量检测人血清中 TP 抗体的浓度。

[0072] 除了制备免疫磁珠时用 TP 抗原(捕获抗原)包被金磁微粒、用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记 TP 抗原(检测抗原)、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记 TP 抗原过程中抗原与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的摩尔比以及建立标准曲线过程中选择的几个 TP 抗体标准品的浓度之外,其他步骤同实施例 1。

[0073] 按照以上实施例检测血清中 PSA、AFP、TSH、TP 抗体的浓度时,将金磁微粒作为固相载体,因为金磁微粒表面的胶体金与蛋白质相互作用可把蛋白质吸附到其金表面,二者之间是物理吸附,无共价吸附,故二者的结合不影响蛋白质的活性,如抗体蛋白的 Fc 片段紧紧吸附在金磁微粒表面的胶体金粒子表面,而抗体蛋白的 Fab 片段则突出在外,从而使 Fab 片段更容易与抗原发生反应。采用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记抗原/抗体的技术,具有操作简便,标记过程不会影响抗体效价,标记成本低,具有通用性等优点。基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法,除具备传统电化学发光免疫分析技术的全部优点外,还避免了传统电化学发光免疫分析方法中生物素化抗原/抗体、用功能化基团修饰磁微球等过程,降低了成本,简化了实验步骤。

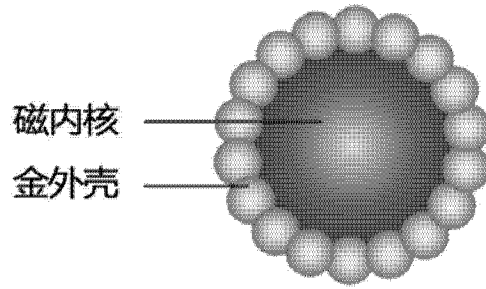


图 1

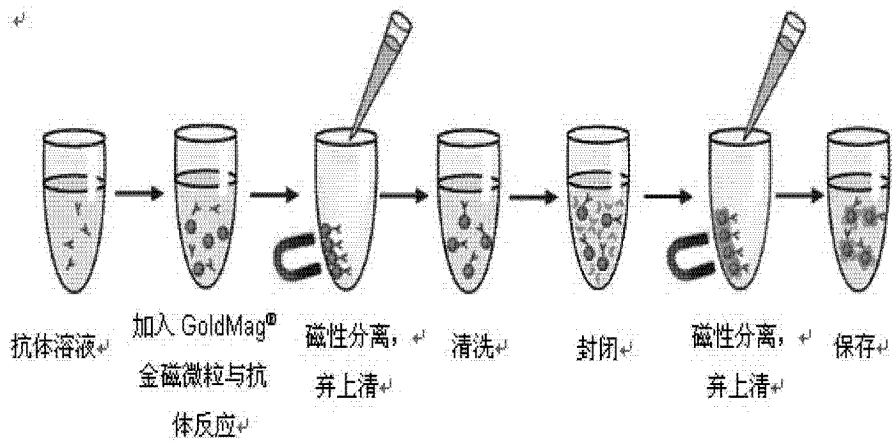


图 2

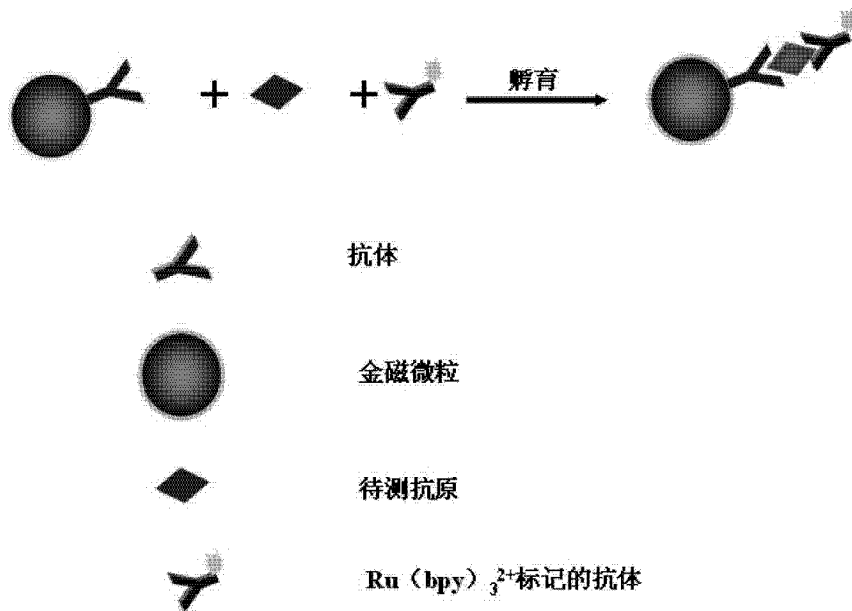


图 3

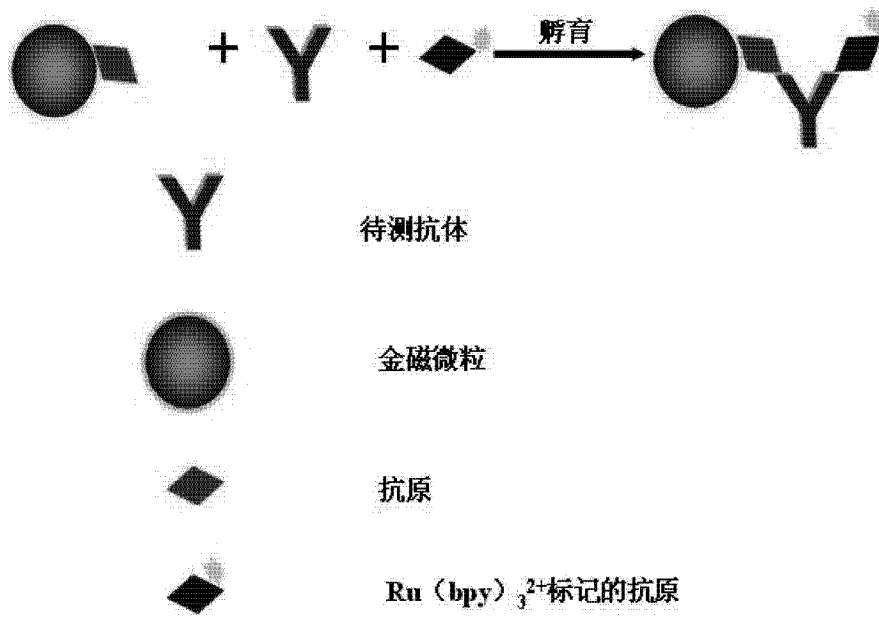


图 4

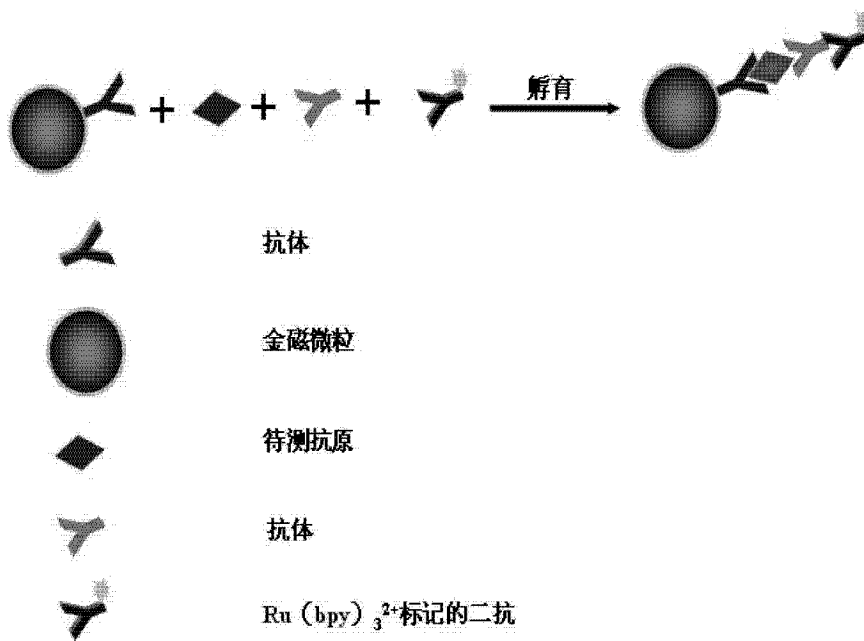


图 5

专利名称(译)	一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法		
公开(公告)号	CN102721804A	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN201210171166.0	申请日	2012-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
[标]发明人	张秦鲁 成晓 崔亚丽		
发明人	张秦鲁 成晓 崔亚丽		
IPC分类号	G01N33/551 G01N33/531		
代理人(译)	陈广民		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于金磁微粒的电化学发光免疫分析方法，实现定量检测人血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中的抗原/抗体的含量，以解决现有技术成本较高、步骤繁琐、反应可控性差、不具有通用性等问题。该方法主要包括以下步骤：1)用金磁微粒制备免疫磁珠；2)用Ru(bpy)₃²⁺标记抗原/抗体；3)定量测定抗原/抗体标准曲线的建立；4)检测待测样品；采用一种新型电化学发光免疫分析技术，具有操作简便，Ru(bpy)₃²⁺标记抗体的过程不影响抗体效价，标记成本低，具有通用性等优点。

