



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107561268 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201710717695.9

(22)申请日 2017.08.21

(71)申请人 基蛋生物科技股份有限公司  
地址 210048 江苏省南京市六合区沿江工业开发区博富路9号

(72)发明人 苏恩本 赵欢 林琦峰 陈赢 胡昕

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218  
代理人 傅婷婷 徐冬涛

(51)Int.Cl.  
G01N 33/543(2006.01)  
G01N 33/577(2006.01)  
G01N 33/532(2006.01)  
G01N 21/76(2006.01)

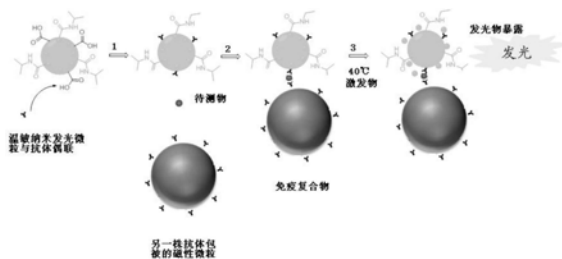
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法及其应用。包括将一株待测抗原的抗体共价偶联到智能型纳米发光微粒表面的羧基上,形成具有放大标记效果的智能型纳米发光微粒;将待测抗原的另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上,加入智能型纳米发光微粒以及含待测抗原的样本,通过抗体-抗原-抗体的相互作用,形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-智能型纳米发光微粒免疫复合物;分离出免疫复合物后,加入激发物,用化学发光检测仪检测发光强度从而计算得到待测抗原的浓度。本发明能够提高发光分子和抗体标记效率,增强发光强度。使得本发明具有灵敏度高,检测范围更宽等优势。



1. 一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法,其特征在于包括将一株待测抗原的抗体共价偶联到智能型纳米发光微粒表面的羧基上,形成具有放大标记效果的智能型纳米发光微粒;将待测抗原的另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上,加入智能型纳米发光微粒以及含待测抗原的样本,通过抗体-抗原的相互作用,形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-智能型纳米发光微粒免疫复合物;经清洗分离出免疫复合物后,加入合适激发物,检测前给予免疫复合物至其对外界刺激产生响应的临界点,智能型纳米发光微粒中的氢键减弱,凝胶崩溃,发光物暴露,产生强烈的发光强度,用化学发光检测仪检测发光强度从而计算得到待测抗原的浓度;所述的智能型纳米发光微粒选自微粒表面含有羧基,微粒内部包裹发光物质的温度敏感型纳米微粒、pH敏感型纳米微粒、光敏感型纳米微粒、盐敏感型纳米微粒、生物分子敏感型纳米微粒或电场敏感型纳米微粒。

2. 根据权利要求1所述的基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法,其特征在于包括将一株待测抗原的抗体共价偶联到温度敏感型纳米发光微粒表面的羧基上,形成具有放大标记效果的温度敏感型纳米发光微粒;将待测抗原的另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上,加入温度敏感型纳米发光微粒以及含待测抗原的样本,通过抗体-抗原-抗体的相互作用,形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-温度敏感型纳米发光微粒免疫复合物;经清洗分离出免疫复合物后,加入已预热到最低临界溶解温度的激发物,检测前加热免疫复合物温度至最低临界溶解温度,温度敏感型纳米发光微粒中的氢键减弱,凝胶崩溃,发光物暴露,产生强烈的发光强度,用化学发光检测仪检测发光强度从而计算得到待测抗原的浓度;其中,所述的温度敏感型纳米发光微粒为表面同时带有羧基和两亲性的异丙基酰胺基,且粒径为50-200纳米的内部包裹发光物质的由异丙基丙烯酰胺以及甲基丙烯酸或丙烯酸经共价交联聚合后形成的水凝胶微粒。

3. 根据权利要求2所述的化学发光免疫分析法,其特征不在于所述的温度敏感型纳米发光微粒通过以下方法制备得到:采用乳液聚合的方法制备异丙基丙烯酰胺和甲基丙烯酸的共聚纳米粒子P (NIPAm-co-MAA);在超声和搅拌同时作用的条件下将发光物质逐滴加入到分散有共聚纳米粒子P (NIPAm-co-MAA)的体系中,使发光物质充分溶胀进入共聚纳米粒子P (NIPAm-co-MAA)中,得到P (NIPAm-co-MAA)/吡啶酯复合纳米粒子即为温度敏感型纳米发光微粒。

4. 根据权利要求2所述的化学发光免疫分析法,其特征不在于所述的发光物质为可以和激发液或者底物作用产生化学发光的物质;优选N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米、吡啶酯、吡啶磺酰胺、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶中的任意一种。

5. 根据权利要求4所述的化学发光免疫分析法,其特征不在于所述的发光物质选自吡啶酯时,所述的最低临界溶解温度为40℃,所述的激发物选自含有0.5wt%过氧化氢溶液的0.2M的硝酸溶液和含有1wt%Tween-20的0.5M氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求2所述的化学发光免疫分析法,其特征不在于所述的固相载体选自磁性微粒、酶标板。

7. 根据权利要求1或2所述的化学发光免疫分析法,其特征不在于共价偶联到只能敏感型纳米发光微粒羧基上的抗体和直接或者间接包被到固相载体上的抗体为针对同一待检抗原的配对的单克隆抗体。

8. 权利要求1-7中任一项所述的基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分

析法在制备化学发光免疫检测试剂盒中的应用。

9. 一种化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于基于权利要求1-7任一项所述的基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法制备;所述的检测试剂盒还包含化学发光激发液系统。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于所述的试剂盒为检测肌钙蛋白I的化学发光免疫检测试剂盒。

11. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于所述的检测肌钙蛋白I的化学发光免疫检测试剂盒包含表面共价偶联了肌钙蛋白I单克隆抗体1的温度敏感型纳米发光微粒,链亲和素-生物素体系间接包被另一株肌钙蛋白I单克隆抗体2的致敏磁性微粒,激发液1:含有0.5wt%过氧化氢溶液的0.2M的硝酸溶液,激发液2:含有1wt% Tween-20的0.5M氢氧化钠溶液;所述的肌钙蛋白I单克隆抗体1和肌钙蛋白I单克隆抗体2为配对抗体。

## 一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学发光免疫分析技术领域,涉及一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法及其应用。

### 背景技术

[0002] 化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA),是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术,是继放免分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。比起传统的酶免分析法,CLIA具有灵敏度更高、检测时间更短、标记方法更简单以及原料成本更低的特点。尽管如此,随着分析检验技术的逐渐普及、以及临床上对于检测待测分子灵敏度需求的进一步提高,迫切需要能在CLIA基础上系统性进一步提升灵敏度,降低检测时间的新技术。

[0003] 已有文献报道,将发光分子(吡啶衍生物、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺ABEI、酶等)和纳米微球共价偶联,然后用发光分子包被的微球标记检测抗体,可以大幅提高检测抗体上的发光分子的标记比例,同时减少共价偶联操作中对于检测抗体上抗原结合位点的破坏。这种方法可以大幅提高CLIA的检测灵敏度。但是由于发光分子与蛋白同时标记在微球上,发光分子与抗体会竞争微球上的偶联官能团,导致标记效率较低,并且发光物依然会挡住抗体位点,导致活性损失。另外微粒表面的偶联官能团数目有限,导致其标记放大效果受限。

[0004] 智能型纳米微粒是一类能对外界刺激产生响应的高分子纳米微粒,外界刺激可以是温度、pH值、溶剂、盐浓度、光(紫外光或可见光)、电场以及化学物质等。根据对外界刺激的响应情况,智能型纳米微粒可以分为以下几种:温度敏感型纳米微粒、pH敏感型纳米微粒、光敏感型纳米微粒、盐敏感型纳米微粒、生物分子敏感型纳米微粒和电场敏感型纳米微粒等。其中最为重要,使用最多的是温度敏感型(温敏型)。以下以温敏型纳米微粒为例阐述发明。

[0005] 温敏型纳米微粒对温度变化的响应形式各异,以下这一种为最常见且研究较多的。当温度发生微小变化时,纳米微粒的体积因溶胀或收缩而发生数倍乃至数十倍的变化,在某一临界温度附近,甚至会发生不连续突变,即所谓的体积相转变。体积发生突变的临界温度被称为低临界溶解温度(Lower Critical solution Temperature, LCST)。这种纳米微粒凝胶往往具有一定比例的疏水和亲水基团,温度的变化可以影响这些基团之间疏水作用和氢键作用的强弱,使纳米微粒结构发生变化,从而引发体积相转变。此类纳米微粒凝胶在达到最低临界溶解温度时,由于水合高分子链的伸展,凝胶的溶胀度会发生突变式增加,以至空隙增大。聚丙烯酰胺水凝胶以及甲基丙烯酸、丙烯酸经共价交联聚合后形成的水凝胶均具有热胀温度敏感性。这种凝胶具有高温溶胀,低温收缩的温度响应行为。原因是低温时凝胶网络内形成氢键,体积发生收缩,高温时氢键解离,凝胶发生溶胀。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法。

[0007] 本发明的另一目的是提供该方法的应用。

[0008] 本发明的目的可通过以下技术方案实现:

[0009] 一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法,包括将一株待测抗原的抗体共价偶联到智能型纳米发光微粒表面的羧基上,形成具有放大标记效果的智能型纳米发光微粒;将待测抗原的另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上,加入智能型纳米发光微粒以及含待测抗原的样本,通过抗体-抗原的相互作用,形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-智能型纳米发光微粒免疫复合物;经清洗分离出免疫复合物后,加入合适激发物,检测前给予免疫复合物至其对外界刺激产生响应的临界点,智能型纳米发光微粒中的氢键减弱,凝胶崩溃,发光物暴露,产生强烈的发光强度,用化学发光检测仪检测发光强度从而计算得到待测抗原的浓度;所述的智能型纳米发光微粒选自微粒表面含有羧基,微粒内部包裹发光物质的温度敏感型纳米微粒、pH敏感型纳米微粒、光敏感型纳米微粒、盐敏感型纳米微粒、生物分子敏感型纳米微粒或电场敏感型纳米微粒。

[0010] 作为本发明一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法的优选:一种基于温敏纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法,包括将一株待测抗原的抗体共价偶联到温敏纳米发光微粒表面的羧基上,形成具有放大标记效果的温敏纳米发光微粒;将待测抗原的另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上,加入温敏纳米发光微粒以及含待测抗原的样本,通过抗体-抗原的相互作用,形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-温敏纳米发光微粒免疫复合物;经清洗分离出免疫复合物后,加入已预热到最低临界溶解温度的激发物,检测前加热免疫复合物温度至最低临界溶解温度,温敏纳米发光微粒中的氢键减弱,凝胶崩溃,发光物暴露,产生强烈的发光强度,用化学发光检测仪检测发光强度从而计算得到待测抗原的浓度;其中,所述的温敏纳米发光微粒为表面同时带有羧基和两亲性的异丙基酰胺基,且粒径为50-200纳米的内部包裹发光物质的由异丙基丙烯酰胺以及甲基丙烯酸或丙烯酸经共价交联聚合后形成的水凝胶微粒。

[0011] 所述的温敏纳米发光微粒优选通过以下方法制备得到:采用乳液聚合的方法制备异丙基丙烯酰胺和甲基丙烯酸共聚的P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子;在超声和搅拌同时作用的条件下将发光物质逐滴加入到分散有P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子的体系中,使发光物质充分溶胀进入聚P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子中,得到P(NIPAm-co-MAA)/吖啶酯复合纳米粒子即为温敏纳米发光微粒。

[0012] 所述的P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子优选通过以下方法制备:准备单体异丙基丙烯酰胺、甲基丙烯酸以及交联剂亚甲基双丙烯酰胺(MBA),其中甲基丙烯酸与单体异丙基丙烯酰胺用量的摩尔比在1:19到1:22,交联剂亚甲基双丙烯酰胺与单体异丙基丙烯酰胺用量的摩尔比在1:61到1:65。预先混合均匀后乳化,乳化均匀后搅拌加热反应7-8小时,产物经离心、洗涤后得P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子。

[0013] 所述的发光物质优选可以和激发液或者底物作用产生化学发光的物质;进一步优选N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米、吖啶酯、吖啶磺酰胺、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶中的任

意一种。

[0014] 所述的发光物质选自吡啶酯时,所述的低临界溶解温度为40℃,所述的激发物选自含有0.5wt%过氧化氢溶液的0.2M的硝酸溶液和含有1wt%Tween-20的0.5M氢氧化钠溶液。

[0015] 所述的固相载体优选自磁性微粒、酶标板等可以作为免疫分析固相载体。

[0016] 共价偶联到温敏纳米发光微粒羧基上的抗体和直接或者间接包被到固相载体上的抗体优选针对同一待检抗原的配对的单克隆抗体。

[0017] 本发明所述的基于温敏纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法在制备化学发光免疫检测试剂盒中的应用。

[0018] 一种化学发光免疫检测试剂盒,基于所述的基于温敏纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法制备;所述的检测试剂盒还包含化学发光激发液系统。

[0019] 所述的试剂盒优选为检测肌钙蛋白I的化学发光免疫检测试剂盒。

[0020] 所述的检测肌钙蛋白I的化学发光免疫检测试剂盒优选包含表面共价偶联了肌钙蛋白I单克隆抗体1的温敏纳米发光微粒,链亲和素-生物素体系间接包被另一株肌钙蛋白I单克隆抗体2的致敏磁性微粒,激发液1:含有0.5wt%过氧化氢溶液的0.2M的硝酸溶液,激发液2:含有1wt%Tween-20的0.5M氢氧化钠溶液;所述的肌钙蛋白I单克隆抗体1和肌钙蛋白I单克隆抗体2为配对抗体。

[0021] 有益效果

[0022] 本发明基于智能型纳米微粒作为发光分子标记的载体,现在就以使用最广泛的温敏纳米微粒为例说明。首先,通过NIPAm(异丙基丙烯酰胺)和MAA(甲基丙烯酸)聚合得到的聚合物,同时将发光分子加入到温敏纳米微粒内部,得到了表面同时带有羧基和两亲性的异丙基酰胺基的温敏纳米发光微粒。一方面因其在溶胀过程中加入发光物,异丙基酰胺基在温度较低时,相互间氢键作用强烈,为凝胶状态可以锁住发光物,可以大大提升微粒的发光物负载量,比传统的通过共价偶联在微粒表面的方法提升了1-2个数量级的负载量;因此智能型纳米微粒可以作为标记的放大体系。另一方面,微粒表面的羧基可以用来偶联抗体。由于微粒表面上没有发光物的竞争,可大大提升抗体的标记效率,以及减少发光物对抗体活性的干扰,使得免疫反应进行更加充分,免疫检测范围得到扩展。

[0023] 本发明基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法,在传统的磁化学发光免疫分析技术基础上有机地整合了智能型纳米材料应变释放发光物技术和纳米粒子的标记放大技术,能够提高发光分子和抗体标记效率,增强发光强度,使得本发明具有灵敏度高,检测范围更宽等优势。

## 附图说明

[0024] 图1本发明的技术路线示意图:

[0025] 其中:1、鼠抗人CTNI单克隆抗体共价偶联到温敏纳米发光微粒的羧基上,2、另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上,加入温敏纳米发光微粒以及待测样本,形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-温敏纳米发光微粒免疫复合物。3、加入已预加热到40℃的激发物。微粒中的氢键减弱,凝胶崩溃,发光物开始暴露。发光物暴露到纳米微粒表面后,可产生更强烈的发光强度。

[0026] 图2无放大体系、仅聚苯乙烯纳米球放大体系,以及温敏微粒标记放大体系的CTNI检测标准曲线

[0027] 图3本发明的体系测试测定的血清标本中CTNI浓度和西门子的测定值的相关性

### 具体实施方式

[0028] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步的说明,以下实施例虽以基于温敏型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法检测CTNI为例说明本发明的方法,但并不应该因此而限定本发明保护范围。本发明的发明点在于将发光物质包裹与表面包含羧基的智能型纳米微粒表面形成智能型纳米发光微粒用于偶联抗体,而现有技术中已公开各类型的智能型纳米微粒的制备,因此,所有的智能型纳米微粒均落入本发明的保护范围。

[0029] 以下实施例中使用的实验仪器和试剂:

[0030] A. 实验仪器

[0031] 加热磁力搅拌器(德国IKA),透射电子显微镜(日本JEOL),恒温水浴锅(HH-60,常州国华电器有限公司),恒温摇床(太仓市科教器材厂),微量移液器(Thermo公司)。离心机(德国Eppendorf公司),磁分离架(天津倍思乐色谱技术开发中心),透析袋(上海泰伯)。

[0032] B. 实验试剂

[0033] CTNI标准品(Biospacific公司),CTNI单克隆抗体1(Hytest,品名cTnI Antibody [3A10A12]货号32-141),CTNI单克隆抗体2(BDbioscience,品名G265-8,货号554717),PBS-T缓冲液( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.35g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  17.9g/L, $\text{KCl}$  0.2g/L, $\text{NaCl}$  8.77g/L,Tween-20 0.5g/L,pH6.96),小牛血清(Gibco公司),CTNI标准品稀释液为含20%小牛血清的PBS-T缓冲液,其它试剂以及耗材若无特殊说明,均购自Sigma-Aldrich公司。

[0034] 实施例1

[0035] 1. 温敏纳米发光微粒的制备:

[0036] A. P(NIPAm-co-MAA) 纳米粒子的制备

[0037] 采用乳液聚合的方法制备异丙基丙烯酰胺和甲基丙烯酸共聚的纳米粒子(P(NIPAm-co-MAA)):在三口烧瓶中加入50mg的十二烷基硫酸钠(SDS)和100mg的过硫酸钾,加100mL去离子水溶解。取单体异丙基丙烯酰胺2mL、甲基丙烯酸0.1mL以及交联剂亚甲基双丙烯酰胺(MBA)0.05mL,预先混合均匀后,加入到三口烧瓶中,乳化均匀后在70℃下搅拌加热反应8小时。产物收集后离心(转速10000rpm,离心30min)去除液体,再用去离子水重悬,如此重复3次,得到P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子。

[0038] B. P(NIPAm-co-MAA) 纳米粒子/吡啶酯发光复合物的制备

[0039] 取100mg的P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子,加50mL去离子水分散,并加入10mg的SDS,使体系充分乳化。将吡啶酯1mg溶解在1mL的二氯甲烷中,在超声和搅拌同时作用的条件下,逐滴加入到分散有P(NIPAm-co-MAA)纳米粒子的体系中,滴加完成后继续搅拌并超声1小时,使吡啶酯充分溶胀进入纳米粒子中。产物收集后离心(转速10000rpm,离心30min)去除液体,再用去离子水重悬,如此重复3次,得到P(NIPAm-co-MAA)/吡啶酯复合纳米粒子,即温敏纳米发光微粒。

[0040] 2将CTNI单抗偶联至温敏纳米发光微粒上并用BSA封闭

[0041] A. 将上述得到的温敏纳米发光微粒清洗去游离的吡啶酯,具体步骤:上述温敏纳

米发光微粒溶液在14000转/分钟下高速离心10分钟除去上清液,用50mM pH=5.5的MES缓冲液清洗重新分散,重复两次以上步骤。

[0042] B.溶液中加入50mM pH=5.5的MES缓冲液EDAC和Sulfo-NHS将上述温敏纳米发光微粒表面的羧基活化为NHS酯后离心清洗两次。

[0043] C.称取活化后的温敏纳米发光微粒,依据偶联的单抗与纳米微粒的质量比为1:20计算CTNI单抗1的量。将CTNI单抗用50mM pH=8.0的硼酸缓冲液稀释成所需浓度,缓慢向CTNI单抗1溶液中滴加入活化后的温敏纳米发光微粒。室温下充分搅拌反应两个小时后,向体系中加入BSA溶液封闭温敏纳米发光微粒上空余的活性位点,使得BSA在体系中的最终浓度为0.25%,充分搅拌封闭20分钟后高速离心洗涤去游离的BSA和CTNI单抗。

[0044] 3抗体间接包被在磁珠固相载体上

[0045] 3.1链亲和素包被磁珠的合成

[0046] A.将羧基磁珠清洗替换所需缓冲液。具体步骤:取1ml羧基磁珠于离心管放置微磁性分离架上磁性分离,约25S后,吸取澄清液体,加入200—1000ul的50mM PH=5.5MES缓冲液重新吹打分散,重复两次以上步骤。

[0047] B.加入MES配制的EDAC以及NHS于悬浮MES的磁性微球中,离心后清洗三次

[0048] C.称重磁性微球,依据偶联的单抗与磁性微球的质量比为1:20计算CTNI单抗的量。将CTNI单抗用50mM PH=7.6的磷酸盐缓冲液稀释成所需的浓度,缓慢将配制好的CTNI单抗滴加到分散好的磁性微球中。室温充分搅拌反应12小时,向体系中加入BSA以及甘氨酸溶液封闭磁性微球上空余的位点,BSA及甘氨酸的浓度为0.2%,充分搅拌封闭1小时后清洗、储存即可。

[0049] 3.2CTNI单克隆抗体标记生物素:

[0050] 生物素用DMSO溶解成浓度为10mg/ml,根据生物素-CTNI单抗2为10:1的摩尔比计算单抗2和生物素的量,将CTNI单抗2用50mM PH=7.6的磷酸盐缓冲液稀释成所需浓度后,向稀释好的CTNI单抗中滴加一定浓度的生物素。37℃下反应半小时后,透析除去未结合的生物素即可。

[0051] 4.激发液系统的配制:

[0052] A.激发液1的:含有0.5%过氧化氢溶液的0.2M的硝酸溶液。

[0053] B.激发液2的:含有1%Tween-20的0.5M氢氧化钠溶液。

[0054] 实施例2

[0055] 为证实本发明的基于温敏纳米发光微粒标记放大体系的显著优势,我们设计以下平行对比试验。同等浓度的CTNI标准品浓度梯度用传统的双抗夹心体系、仅通过聚苯乙烯纳米球的标记放大体系,以及本发明的标记放大体系分别检测,并记录发光值拟合标准曲线。以上三个体系中所用的CTNI检测抗体的浓度相等。

[0056] A.传统CLIA双抗夹心法:

[0057] 用PBS缓冲液稀释配制浓度梯度0,0.003,0.008,0.023,0.069,0.206,0.617,1.852,5.556,16.667,50.000ng/mL的CTNI标准品。在反应杯中,加入链亲和素包被的磁性微球10μL,生物素化的CTNI一株单克隆抗体50μL,CTNI标准品100μL,以及直接标记了吡啶衍生物的CTNI另一种单克隆抗体。37℃温浴20min后,用PBS-T清洗液磁性分离清洗三次。先后加入激发液1和2,用化学发光检测仪测定不同浓度CTNI标准品产生的发光值。参考美国

临床实验室标准化委员会 (CLSI) 发布的《确定检测低限和定量检测限的方案》(EP17-A) 文件,对本反应体系下的定量检测限LOQ进行测定。LOQ:本实验室依据临床要求设定检测CTNI的总误差目标为20%,总误差的估计值 (TE) = 偏倚+2×变异系数 (CV)。

[0058] B. 聚苯乙烯纳米球标记放大体系:

[0059] 表面羧基聚苯乙烯纳米球用50mM pH5.5的MES缓冲液反复清洗后加入EDC和 Sulfo-NHS将纳米球表面的羧基活化为NHS酯后再离心清洗两次。

[0060] 称取活化后的温敏纳米发光微粒,依据偶联的单抗与纳米微粒的质量比为1:20计算CTNI单抗1的量,将CTNI单抗用50mM pH8.0的硼酸缓冲液稀释成所需浓度,缓慢向CTNI单抗溶液中滴加入活化后的纳米球。室温下充分搅拌反应两个小时后,向体系中加入BSA溶液封闭纳米球上空余的活性位点,使得BSA在体系中的最终浓度为0.25%,充分搅拌封闭20分钟即可得到CTNI单抗包被的聚苯乙烯纳米球。

[0061] 按照吡啶衍生物:CTNI单克隆抗体为1:20的摩尔比标记上述偶联了CTNI单抗的聚苯乙烯纳米球。将吡啶衍生物用DMSO充分溶解后缓慢滴加入偶联了CTNI单抗的温敏纳米发光微粒溶液中,4℃下避光反应过夜,透析除去溶液中未结合上的吡啶衍生物。即可得到吡啶酯标记的包被了CTNI单抗的聚苯乙烯纳米球,简称致敏聚苯乙烯纳米球。

[0062] 用PBS缓冲液稀释配制浓度梯度为0,0.003,0.008,0.023,0.069,0.206,0.617,1.852,5.556,16.667,50.000ng/mL的CTNI标准品。在反应杯中,加入链亲和素包被的磁性微球10μL,生物素化的CTNI一株单克隆抗体50μL,CTNI标准品100μL,50u1敏聚苯乙烯纳米球。37℃温浴20min后,用PBS-T清洗液磁性分离清洗三次。先后加入激发液1和2,用化学发光检测仪测定不同浓度CTNI标准品产生的发光值,用五参数曲线拟合后计算回收率。参考美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 发布的《确定检测低限和定量检测限的方案》(EP17-A) 文件,对本反应体系下的定量检测限LOQ进行测定。LOQ:本实验室依据临床要求设定检测CTNI的总误差目标为20%,总误差的估计值 (TE) = 偏倚+2×变异系数 (CV)。

[0063] C. 基于实施例2温敏纳米发光微粒标记放大体系:

[0064] 用PBS缓冲液稀释配制浓度梯度0,0.003,0.008,0.023,0.069,0.206,0.617,1.852,5.556,16.667,50.000ng/mL的CTNI标准品。在反应杯中,加入链亲和素包被的磁性微球10μL,生物素化的CTNI一株单克隆抗体50μL,CTNI标准品100μL,以及50u1致敏温敏纳米发光微粒。37℃温浴20min后,用PBS-T清洗液磁性分离清洗三次。先后加入激发液1和2,用化学发光检测仪测定不同浓度CTNI标准品产生的发光值。参考美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 发布的《确定检测低限和定量检测限的方案》(EP17-A) 文件,对本反应体系下的定量检测限LOQ进行测定。LOQ:本实验室依据临床要求设定检测CTNI的总误差目标为20%,总误差的估计值 (TE) = 偏倚+2×变异系数 (CV)。

[0065] 结果如表1,表2所示,在80%-120%的回收率范围内,传统的双抗夹心法的LOQ仅为0.069ng/mL,聚苯乙烯纳米球的标记放大体系的LOQ为0.023ng/mL,大约有3倍的提高。聚苯乙烯纳米球的高比表面积使得更多的抗体可以偶联在纳米球上,因此可以形成更多的免疫复合体。另外,抗体以及封闭蛋白包被的纳米球可以提供更多的吡啶衍生物标记位点,增加了发光物质的标记量,从而提高了发光值和灵敏度。利用本发明所述的体系后,LOQ为0.008ng/mL,相比较起传统的模式,有了8.6倍以上的提高。比起聚苯乙烯纳米球的放大体系,也有3倍的提高。这一结果证实了本发明体系的标记放大性质,不仅仅实现了纳米球的

标记放大增强性能,同时利用温敏纳米发光微粒的受热溶胀暴露发光物的特性,进一步大幅提高了灵敏度和发光值。

[0066] 表1无放大体系、仅聚苯乙烯纳米球放大体系,以及温敏微粒标记放大体系的CTNI检测回收率的影响

[0067]

CTNI 标准品浓度 (ng/mL)	不同体系对检测回收率的影响		
	无放大或增强	仅聚苯乙烯纳米球放大	温敏微粒标记放大
0.003	/	/	39%
0.008	/	66%	118%
0.023	77%	92%	109%
0.069	92%	102%	104%
0.206	92%	92%	104%
0.617	90%	87%	98%
1.852	104%	104%	98%
5.556	107%	103%	101%
16.667	93%	97%	95%
50.000	107%	108%	97%

[0068] 表2无放大体系、仅聚苯乙烯纳米球放大体系,以及温敏微粒标记放大体系的CTNI检测定量检测限的确定

[0069]

不同体系	无放大标记			仅聚苯乙烯放大			温敏微粒标记放大		
	0.008	0.023	0.069	0.008	0.023	0.069	0.008	0.023	0.069
理论浓度 (ng/mL)									
变异系数 CV	24.25%	12.52%	5.26%	18.23%	4.25%	3.26%	3.56%	3.02%	3.51%
回算浓度 (ng/mL)	0	0.018	0.065	0.005	0.021	0.07	0.009	0.025	0.071
偏倚	100.00%	21.74%	5.80%	37.50%	8.70%	1.45%	12.50%	8.70%	2.90%
总误差	148.50%	46.78%	16.32%	73.96%	17.20%	7.97%	19.62%	14.74%	9.92%

[0070] 实施例3本发明的体系测试测定的血清标本中CTNI浓度和西门子的测定值的相关性对比实验

[0071] 为验证本发明体系试剂盒的准确性,多份血清标本用西门子CTNI化学发光检测试剂测试CTNI含量后,挑选出其中梯度合适的60份。用本发明的体系分别测定CTNI含量,作图比较相关性。由图3可见,两种体系表现出良好地相关性, $R^2$ 值高达0.9896。证实了本发明体系以及依据该体系的试剂盒除了具有超高灵敏度,更宽的检测范围外,还有极佳的准确性。

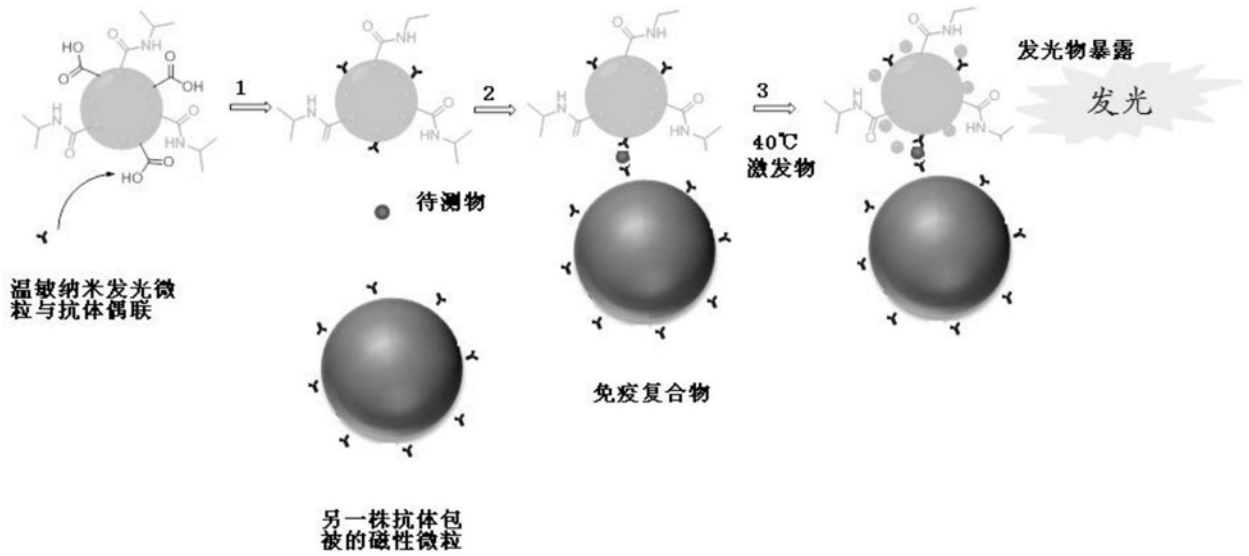


图1

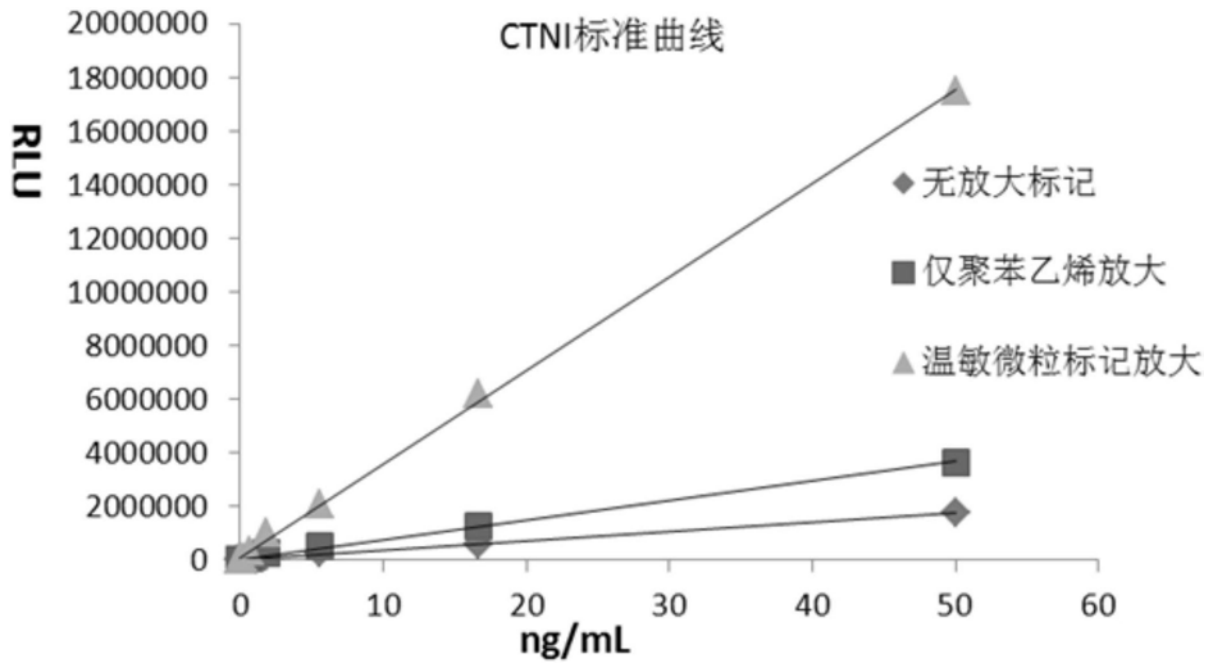


图2

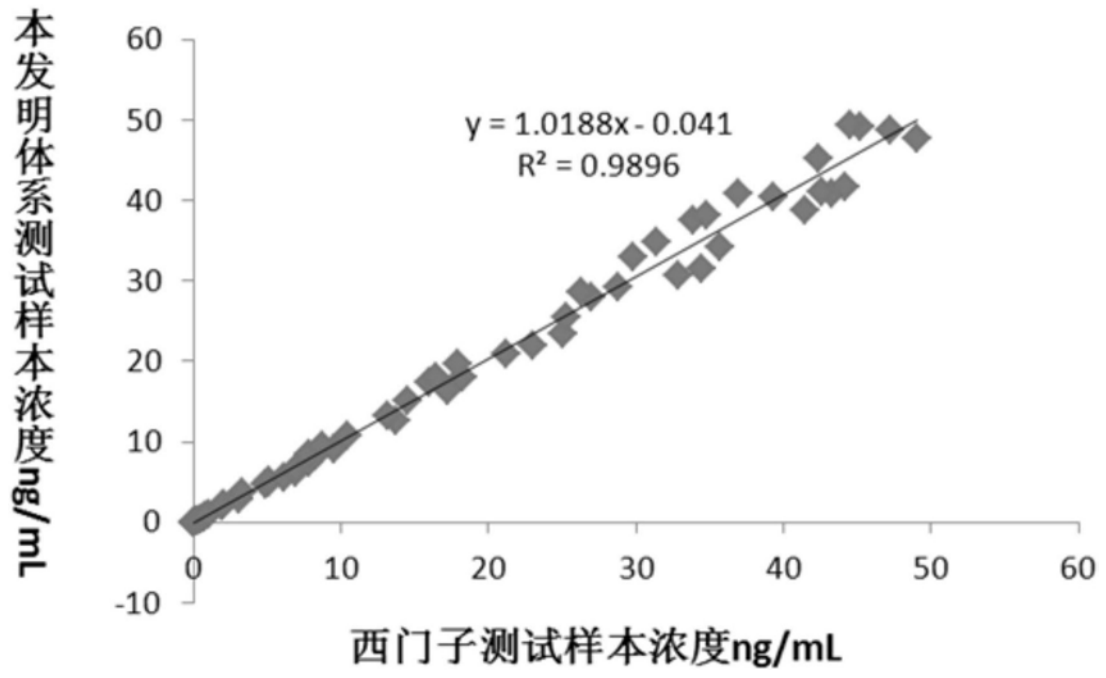


图3

专利名称(译)	一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107561268A</a>	公开(公告)日	2018-01-09
申请号	CN201710717695.9	申请日	2017-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
[标]发明人	苏恩本 赵欢 林琦峰 陈赢 胡昕		
发明人	苏恩本 赵欢 林琦峰 陈赢 胡昕		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/532 G01N21/76		
其他公开文献	CN107561268B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于智能型纳米发光微粒标记放大的化学发光免疫分析法及其应用。包括将一株待测抗原的抗体共价偶联到智能型纳米发光微粒表面的羧基上，形成具有放大标记效果的智能型纳米发光微粒；将待测抗原的另一株抗体直接或者间接包被在固相载体上，加入智能型纳米发光微粒以及含待测抗原的样本，通过抗体-抗原-抗体的相互作用，形成固相载体-抗体-待测抗原-抗体-智能型纳米发光微粒免疫复合物；分离出免疫复合物后，加入激发物，用化学发光检测仪检测发光强度从而计算得到待测抗原的浓度。本发明能够提高发光分子和抗体标记效率，增强发光强度。使得本发明具有灵敏度高，检测范围更宽等优势。

