



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106226523 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610519655.9

(22)申请日 2016.07.04

(71)申请人 福建广生堂药业股份有限公司
地址 355300 福建省宁德市柘荣县东源乡
富源工业区

(72)发明人 刘婕 吴文强 李国栋

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 孟旭 王为

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

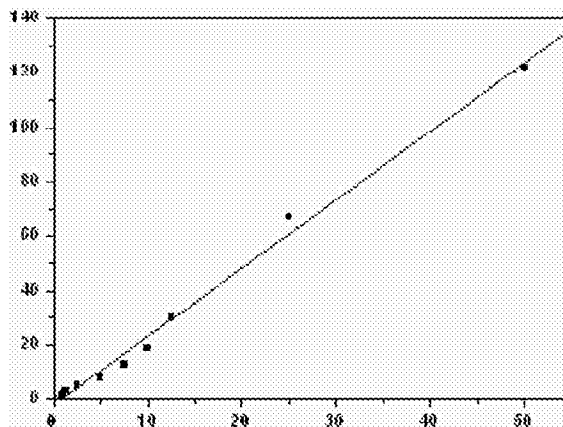
权利要求书3页 说明书18页 附图2页

(54)发明名称

一种免疫标志物的检测方法、试剂和检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种免疫标志物的检测方法、所用试剂和检测试剂盒,本发明的检测方法包括以下步骤:步骤1,表面偶联抗免疫标志物抗体的磁微粒A的制备,和表面偶联免疫标志物抗原的磁微粒B的制备;步骤2,荧光标记的抗免疫标志物抗体的制备;步骤3,免疫标志物含量的检测:血浆或血清样品和磁微粒A反应,反应完毕将免疫标志物洗脱,加入荧光标记的抗免疫标志物抗体孵育,再加入磁微粒B继续孵育,然后磁性分离,用荧光分光光度计检测样品荧光值,计算样品中免疫标志物含量。



1. 一种检测血浆或血清中免疫标志物含量的方法:所述方法包括以下步骤:

步骤1,表面偶联抗免疫标志物抗体的磁微粒A的制备,和表面偶联免疫标志物抗原的磁微粒B的制备;

步骤2,荧光标记的抗免疫标志物抗体的制备;

步骤3,免疫标志物含量的检测:血浆或血清样品和磁微粒A反应,反应完毕将免疫标志物洗脱,加入荧光标记的抗免疫标志物抗体孵育,再加入磁微粒B继续孵育,然后磁性分离,用荧光分光光度计检测样品荧光值,计算样品中免疫标志物含量;

其中所述免疫标志物为可以发生抗原抗体结合反应的生物标志物,选自:蛋白,酶类,多肽,激素,细胞因子,化学分子,黏附分子,可溶性受体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述磁微粒A和磁微粒B的制备,方法如下:将磁微粒制备成磁微粒悬浮液,磁微粒悬浮液与抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原偶联:将抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原与磁微粒悬浮液混合孵育偶联,偶联后用封闭液封闭,得到偶联免疫标志物抗体的磁微粒A和偶联免疫标志物抗原的磁微粒B。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,其中,所述与免疫标志物特异性结合的抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,其中,磁微粒与免疫标志物抗原的偶联条件选自如下条件:

磁微粒粒径120nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;

磁微粒粒径180nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;

磁微粒粒径200nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;

磁微粒粒径300nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;

磁微粒粒径500nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;

或者磁微粒粒径800nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,其中,磁微粒与抗免疫标志物抗体的偶联条件选自如下条件:

磁微粒粒径120nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;

磁微粒粒径180nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;

磁微粒粒径200nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;

磁微粒粒径300nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;

磁微粒粒径500nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;

或者磁微粒粒径800nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤如下:

步骤(1)取磁微粒,加入磁微粒体积2~50倍的洗涤缓冲液,混匀,然后在磁力架上磁性分离,弃上清液;重复上一步骤,然后将磁微粒在与其等量的偶联缓冲液中悬浮,得到磁微粒悬浮液;

步骤(2)向抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原中加入体积0.01~1倍的步骤(1)处理的磁微粒悬浮液,加入偶联缓冲液,孵育,直至磁微粒偶联完全;磁性分离,保留磁微粒;磁微粒偶联结束后,加入封闭液混匀,孵育,磁性分离,得到偶联免疫标志物抗体的磁微粒A和偶联免疫标志物抗原的磁微粒B;

步骤(3)荧光标记的抗免疫标志物抗体的制备:抗免疫标志物抗体溶解于碳酸盐缓冲液中,荧光素溶解于DMSO中,将荧光素逐滴缓慢加入抗免疫标志物抗体溶液中,4℃避光搅拌12~20h,用G-25葡聚糖凝胶去除游离的荧光素;

步骤(4)取待测样品,加入样品体积1~100倍的磁微粒A,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,使免疫标志物抗原抗体充分反应;置于磁力架上磁性分离,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗磁微粒复合物,置于磁力架上磁性分离,弃上清液;加入与抗体等量的洗脱液,混匀,重悬磁微粒,室温孵育5min,置于磁力架上磁性分离,保留上清液;加入样品体积1~100倍的荧光标记免疫标志物抗体,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;加入磁微粒A体积1~100倍的磁微粒B,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;置于磁力架上磁性分离,保留上清液,采用荧光分光光度计检测样品荧光值,并对照标准曲线计算样品中免疫标志物含量。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤如下:

(1)取磁微粒置于EP管中,加入磁微粒体积10~20倍的洗涤缓冲液,混匀,然后在磁力架上磁性分离,弃上清液;重复上一步骤,然后将磁微粒在与其等量的偶联缓冲液中悬浮,得到磁微粒悬浮液;

(2)加入磁微粒悬浮液体积0.2~0.3倍的需偶联的抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原于盛有磁微粒悬浮液的EP管中,并加入磁微粒悬浮液体积10倍的偶联缓冲液,混匀;将EP管置于旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,直至磁微粒偶联完全;将EP管置于磁力架上磁性分离,保留磁微粒;表面偶联抗免疫标志物抗体的为磁微粒A,表面偶联免疫标志物抗原的为磁微粒B,上清液用于检测偶联效率;

(3)磁微粒偶联结束后,加入磁微粒悬浮液体积10倍的封闭液,混匀,将EP管置于旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,将EP管置于磁力架上磁性分离,弃上清液;重复上一步骤一次;

(4)取待测血浆或血清样品,加入样品体积1~100倍的磁微粒A,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,使免疫标志物抗原抗体充分反应;置于磁力架上磁性分离,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗磁微粒复合物,置于磁力架上磁性分离,弃上清液;加入与抗体等量的洗脱液,混匀,重悬磁微粒,室温孵育5min,置于磁力架上磁性分离,保留上清液;加入样品体积1~100倍的荧光标记免疫标志物抗体,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;加入磁微粒A体积1~100倍的磁微粒B,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;置于磁力架上磁性分离,保留上清液,采用荧光分光光度计检测样品荧光值,并对照标准曲线计算样品中免疫标志物含量。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,其中,

偶联缓冲液选自:碳酸氢盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、硫酸盐缓冲液的一种或多种的组合,浓度为1~100mM,pH为8.0~10.0;

洗涤缓冲液选自:甘氨酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、氯化盐缓冲液的一种或多种的组合,浓度为2~200mM,pH为7.0~8.0;

洗脱液选自:甘氨酸、Tris Buffer、EDTA溶液、IPTG溶液、L-谷氨酸溶液、MES Buffer的一种或多种的组合,浓度为0.01~10M,pH为2.0~3.0;

封闭液选自:BSA、酪蛋白、甘氨酸的一种或多种的组合,浓度为0.05%~5%,pH为8.0

~9.0;

保存液选自:BST缓冲液、Tween-20、NaN₃、BSA的一种或多种的组合,浓度为1~50mM,pH为8~10。

9.一种采用权利要求1方法检测免疫标志物的试剂盒,包括:

磁微粒,以及任选的以下组分:偶联免疫标志物抗体的磁微粒A,偶联免疫标志物抗原的磁微粒B,免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液,磁力架。

10.一种采用权利要求1方法检测免疫标志物的试剂盒,包括:

偶联免疫标志物抗体的磁微粒A,

偶联免疫标志物抗原的磁微粒B,

以及任选的以下组分:免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液,磁力架。

一种免疫标志物的检测方法、试剂和检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种医学检测方法,特别涉及一种免疫标志物磁微粒免疫荧光检测方法、以及免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂和检测试剂盒。

背景技术

[0002] 生物标志物是生物体受到损害之后,在不同生物学水平(分子、细胞、个体等)上因受到影响而异常化的信号指标,可以为生物体受到的伤害提供早期警报。这种信号指标可以是细胞分子结构和功能的变化,可以是某一生化代谢过程的变化或生成异常的代谢产物或其含量,可以是某一生理活动或某一生理活性物质的异常表现,可以是个体表现出的异常现象,可以是种群或群落的异常变化,可以是生态系统的异常变化。本发明所述生物标志物是可供客观测定和评价的普通生理或病理或治疗过程中的特征性的生化指标,通过对其测定可以获知机体当前所处的生物学过程中的进程。特异性的生物标志物的检测对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控具有帮助作用。

[0003] 免疫标志物是指可以发生抗原抗体结合反应的生物标志物,是可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生的改变的生物指标,可反应机体的炎症反应状态或者免疫应答状态,帮助判断机体是否存在感染、免疫反应的状况以及机体炎症反应的水平、组织损伤的程度(即病情的严重程度)。作为具体例子,可举出蛋白,酶类,多肽类,激素类,细胞因子,化学分子,黏附分子,可溶性受体等,但并不限于这些。通过对其测定有助于对疾病的早期辅助诊断、严重程度的评估及预后做出判断,选择适当的治疗,改善预后。

[0004] 免疫标志物对疾病的诊断价值是肯定的,但是一些常规的检测方法缺乏足够的敏感性,导致检测结果不准确。临床常用免疫分析法检测免疫标志物的含量,利用抗原抗体特异性结合反应进行检测,免疫标记技术进行结果判定,将荧光素、同位素或酶等示踪物质标记抗体(或抗原)进行抗原-抗体反应,通过对免疫复合物中的标记物的检测,达到对免疫反应进行监测的目的。常用的免疫分析标记技术包括酶免疫分析、放射免疫分析、荧光酶免疫分析、胶体金免疫技术、发光免疫技术等。其中酶免疫分析灵敏度较低且操作复杂;放射免疫分析灵敏精确、样本用量少,但检测有效期较短且具有放射性污染;胶体金免疫技术标记物的制备简便,灵敏直观,但同时受影响因素较多;发光免疫技术检测步骤较复杂,本底较高且结果不稳定。

[0005] 现有技术中,磁微粒化学发光免疫分析技术综合了磁微粒载体技术和化学发光免疫检测技术,使测量结果更准确,更稳定。该技术包括:

[0006] 磁微粒化学发光—双抗体夹心法:待测抗原同荧光素标记的抗体及酶标抗体结合形成“三明治”结构的复合物。随后加入连有抗荧光素抗体的磁微粒,通过抗荧光素抗体与荧光素的特异性结合使抗原抗体复合物连接在磁微粒上,在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离。去上清后清洗沉淀的复合物,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到

基态时便发出光子,形成发光反应,通过光量子阅读系统记录光子能量,并通过计算机处理系统将光能量强度在标准曲线上转换为待测抗原的浓度,并报告结果。

[0007] 磁微粒化学发光—竞争法:将待测抗原、用过量包被磁微粒的抗体和定量的标记抗原同时加入反应杯温育,其免疫反应的结合形式有两种,一是标记抗原与抗体结合形成复合物;二是待测抗原与抗体结合形成复合物。如待测标本中含有待测抗原,则与标记抗原以同样的机会与磁微粒包被的抗体结合,竞争性地占去了标记抗原与磁微粒包被的抗体结合的机会,使标记抗原与磁微粒包被的抗体的结合量减少。由于磁微粒包被的抗体是过量的,足以与待测抗原结合。磁微粒在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的复合物与未结合的其它物质分离。去上清后清洗沉淀的复合物,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,通过光量子阅读系统记录光子能量,并通过计算机处理系统将光能量强度在标准曲线上转换为待测抗原的浓度,并报告结果。

[0008] 磁微粒化学发光—间接法:待测抗体与荧光素标记的抗原结合,随后加入包被着抗荧光素抗体的磁微粒,通过抗荧光素抗体与荧光素的特异性结合使抗原抗体复合物连接在磁微粒上,在外加磁场中直接沉淀,去上清后清洗沉淀的复合物,加入酶标抗体,形成磁微粒—抗原—抗体—酶标二抗夹心免疫复合物。再次清洗后,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,通过光量子阅读系统记录光子能量,并通过计算机处理系统将光能量强度在标准曲线上转换为待测抗体的浓度,并报告结果。

[0009] 但上述技术存在一些缺陷:如:

[0010] 间断的、闪烁性发光不稳定,

[0011] 反应过程中易发生裂变,结果不稳定,

[0012] 以微孔板为载体,测试成本高、时间长,

[0013] 需对结合相、游离相进行分离,操作步骤多,

[0014] 瞬间产生的化学发光峰值很快衰减,

[0015] 本底较高,干扰妨碍应用,

[0016] 不易自动化等。

[0017] 基于以上不足,本发明建立了一种免疫标志物磁微粒免疫荧光检测方法,使用磁微粒A与免疫标志物特异性结合的抗体偶联,使用荧光素标记该抗体作为检测抗体,再使用偶联免疫标志物的磁微粒B清除过量的检测抗体,通过检测荧光强度计算目标检测物免疫标志物的含量,实现对免疫标志物含量的简便快速、灵敏准确的检测。

发明内容

[0018] 本发明提供一种检测血浆或血清中免疫标志物含量的方法:所述方法包括以下步骤:

[0019] 步骤1,表面偶联抗免疫标志物抗体的磁微粒A的制备,和表面偶联免疫标志物抗原的磁微粒B的制备;

[0020] 步骤2,荧光标记的抗免疫标志物抗体的制备;

[0021] 步骤3,免疫标志物含量的检测:血浆或血清样品和磁微粒A反应,反应完毕将免疫

标志物洗脱,加入荧光标记的抗免疫标志物抗体孵育,再加入磁微粒B继续孵育,然后磁性分离,用荧光分光光度计检测样品荧光值,计算样品中免疫标志物含量;

[0022] 其中所述免疫标志物为可以发生抗原抗体结合反应的生物标志物,选自:蛋白,酶类,多肽,激素,细胞因子,化学分子,黏附分子,可溶性受体。

[0023] 本发明所述的方法,其中所述磁微粒A和磁微粒B的制备,方法如下:将磁微粒制备成磁微粒悬浮液,磁微粒悬浮液与抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原偶联:将抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原与磁微粒悬浮液混合孵育偶联,偶联后用封闭液封闭,得到偶联免疫标志物抗体的磁微粒A和偶联免疫标志物抗原的磁微粒B。

[0024] 本发明所述的方法,其中,所述与免疫标志物特异性结合的抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

[0025] 本发明所述的方法,其中,磁微粒与免疫标志物抗原的偶联条件选自如下条件:

[0026] 磁微粒粒径120nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;

[0027] 磁微粒粒径180nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;

[0028] 磁微粒粒径200nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;

[0029] 磁微粒粒径300nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;

[0030] 磁微粒粒径500nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;

[0031] 或者磁微粒粒径800nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10;本发明所述的方法,其中,磁微粒与抗免疫标志物抗体的偶联条件选自如下条件:

[0032] 磁微粒粒径120nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;

[0033] 磁微粒粒径180nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;

[0034] 磁微粒粒径200nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;

[0035] 磁微粒粒径300nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;

[0036] 磁微粒粒径500nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;

[0037] 或者磁微粒粒径800nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。本发明所述的方法,步骤如下:

[0038] 步骤(1)取磁微粒,加入磁微粒体积2~50倍的洗涤缓冲液,混匀,然后在磁力架上磁性分离,弃上清液;重复上一步骤,然后将磁微粒在与其等量的偶联缓冲液中悬浮,得到磁微粒悬浮液;

[0039] 步骤(2)向抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原中加入体积0.01~1倍的步骤(1)处理的磁微粒悬浮液,加入偶联缓冲液,孵育,直至磁微粒偶联完全;磁性分离,保留磁微粒;磁微粒偶联结束后,加入封闭液,混匀,孵育磁性分离,得到偶联免疫标志物抗体的磁微粒A和偶联免疫标志物抗原的磁微粒B;

[0040] 步骤(3)荧光标记的抗免疫标志物抗体的制备:抗免疫标志物抗体溶解于碳酸盐缓冲液中,荧光素溶解于DMSO中,将荧光素逐滴缓慢加入抗免疫标志物抗体溶液中,4 $^{\circ}$ C避光搅拌12~20h,用G-25葡聚糖凝胶去除游离的荧光素;

[0041] 步骤(4)取待测样品,加入样品体积1~100倍的磁微粒A,于室温旋转孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h,使免疫标志物抗原抗体充分反应;置于磁力架上磁性分离,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗磁微粒复合物,置于磁力架上磁性分离,弃上清液;加入与抗体等量的洗脱液,混匀,重悬磁微粒,室温孵育5min,置于磁力架上磁性分离,保留上清液;加入样品体

积1~100倍的荧光标记免疫标志物抗体,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;加入磁微粒A体积1~100倍的磁微粒B,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;置于磁力架上磁性分离,保留上清液,采用荧光分光光度计检测样品荧光值,并对照标准曲线计算样品中免疫标志物含量。

[0042] 本发明所述的方法,优选的步骤如下:

[0043] (5)取磁微粒置于EP管中,加入磁微粒体积10~20倍的洗涤缓冲液,混匀,然后在磁力架上磁性分离,弃上清液;重复上一步骤,然后将磁微粒在与其等量的偶联缓冲液中悬浮,得到磁微粒悬浮液;

[0044] (6)加入磁微粒悬浮液体积0.2~0.3倍的需偶联的抗免疫标志物抗体或免疫标志物抗原于盛有磁微粒磁微粒悬浮液的EP管中,并加入磁微粒悬浮液体积10倍的偶联缓冲液,混匀;将EP管置于旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,直至磁微粒偶联完全;将EP管置于磁力架上磁性分离,保留磁微粒;表面偶联抗免疫标志物抗体的为磁微粒A,表面偶联免疫标志物抗原的为磁微粒B,上清液用于检测偶联效率;

[0045] (7)磁微粒偶联结束后,加入磁微粒悬浮液体积10倍的封闭液,混匀,将EP管置于旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,将EP管置于磁力架上磁性分离,弃上清液;重复上一步骤一次;

[0046] (8)取待测血浆或血清样品,加入样品体积1~100倍的磁微粒A,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,使免疫标志物抗原抗体充分反应;置于磁力架上磁性分离,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗磁微粒复合物,置于磁力架上磁性分离,弃上清液;加入与抗体等量的洗脱液,混匀,重悬磁微粒,室温孵育5min,置于磁力架上磁性分离,保留上清液;加入样品体积1~100倍的荧光标记免疫标志物抗体,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;加入磁微粒A体积1~100倍的磁微粒B,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h;置于磁力架上磁性分离,保留上清液,采用荧光分光光度计检测样品荧光值,并对照标准曲线计算样品中免疫标志物含量。

[0047] 本发明所述的方法,其中,

[0048] 偶联缓冲液选自:碳酸氢盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、硫酸盐缓冲液的一种或多种的组合,浓度为1~100mM,pH为8.0~10.0;

[0049] 洗涤缓冲液选自:甘氨酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、氯化盐缓冲液的一种或多种的组合,浓度为2~200mM,pH为7.0~8.0;

[0050] 洗脱液选自:甘氨酸、Tris Buffer、EDTA溶液、IPTG溶液、L-谷氨酸溶液、MES Buffer的一种或多种的组合,浓度为0.01~10M,pH为2.0~3.0;

[0051] 封闭液选自:BSA、酪蛋白、甘氨酸的一种或多种的组合,浓度为0.05%~5%,pH为8.0~9.0;

[0052] 保存液选自:BST缓冲液、Tween-20、Na₃N₃、BSA的一种或多种的组合,浓度为1~50mM,pH为8~10。

[0053] 本发明还提供一种采用本发明方法检测免疫标志物的试剂盒,包括:

[0054] 磁微粒,以及任选的以下组分:偶联免疫标志物抗体的磁微粒A,偶联免疫标志物抗原的磁微粒B,免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液,磁力架。优选的采用本发明方法检测免疫标志物的试剂盒,包括:

[0055] 偶联免疫标志物抗体的磁微粒A,

[0056] 偶联免疫标志物抗原的磁微粒B,

[0057] 以及任选的以下组分:免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液,磁力架。

[0058] 本发明所述的试剂盒,包括:盒体、盒体内的试剂,试剂槽,说明书,所述试剂放置在试剂槽中。

[0059] 本发明的目的在于提供:与以往的方法相比,简便快速,高灵敏度,高准确性,安全无毒,可回收免疫标志物磁微粒免疫荧光检测方法,以及其检测试剂和检测试剂盒。

[0060] 本发明人对于免疫标志物的检测方法进行了深入的研究,结果发现:通过磁微粒分离荧光免疫分析技术,与以往的方法相比,具有简便快速,灵敏度高,准确性高,安全无毒,可回收等优点,从而完成了本发明。

[0061] 即,本发明提供免疫标志物的磁微粒分离免疫荧光分析检测方法,该检测方法包括:使用磁微粒作为固相载体,偶联与免疫标志物特异性结合的抗体作为包被抗体,使用荧光素标记与免疫标志物特异性结合的抗体作为检测抗体,最后使用偶联免疫标志物的磁微粒清除过量的检测抗体,通过荧光强度定量检测样品中的免疫标志物。本发明还提供免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂,该免疫荧光检测试剂包含:磁微粒,免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液。本发明进一步提供免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂盒,该检测试剂盒包括本发明所述的免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂。

[0062] 根据本发明可提供简便快速,高灵敏度,高准确性,安全无毒,可回收的的免疫标志物的磁微粒分离免疫荧光分析检测方法、以及用于该检测的试剂和检测试剂盒。本发明的方法与以往的方法相比,检测效率得到大幅提高,作为免疫标志物检测方法,其具有简便快速,灵敏度高,准确性高,安全无毒,可回收等优点。

[0063] 本发明的检测方法中,使用磁性微粒分别偶联免疫标志物、与免疫标志物特异性结合的抗免疫标志物抗体、和荧光标记的抗免疫标志物抗体进行磁微粒分离免疫荧光分析检测。通过此方法,可以合乎需要地简化操作步骤,降低检测成本,提高检测值的准确性。

[0064] 本发明所述免疫标志物是指可以发生抗原抗体结合反应的生物标志物,是可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生的改变的生物指标,可反应机体的炎性反应状态或者免疫应答状态,帮助判断机体是否存在感染、免疫反应的状况以及机体炎症反应的水平、组织损伤的程度(即病情的严重程度)。作为具体例子,可举出蛋白,酶类,多肽类,激素类,细胞因子,化学分子,黏附分子,可溶性受体等,但并不限于这些。通过对其测定有助于对疾病的早期辅助诊断、严重程度评估及预后做出判断,选择适当的治疗,改善预后。

[0065] 免疫标志物抗原,即免疫标志物抗原蛋白标准品,为市售商品,可按照常规方法购买获得,其特性如下:产品浓度1mg/ml,纯化方法为HPLC,纯度 $\geq 98\%$ 。

[0066] 抗免疫标志物抗体是与免疫标志物特异性结合的抗体,可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。从免疫检测的再现性等角度考虑,可优选使用单克隆抗体。另外,这些抗体也可以保持与对应抗原的结合性的抗体片段(抗原结合性片段)的形式使用。

[0067] 多克隆抗体、单克隆抗体和抗原结合性片段的制备方法本身是周知的常规方法,

抗免疫标志物抗体或及抗原结合性片段可按照常规方法制备。另外,这些抗体也存在市售商品,因此也可以使用市售的抗体。

[0068] 抗免疫标志物单克隆抗体例如可通过周知的杂交瘤法获得:将免疫标志物或其部分片段作为免疫原与适当的佐剂混合用于免疫动物(人除外),从该动物采集脾细胞或淋巴细胞等抗体生成细胞,将其与骨髓瘤细胞融合,制备杂交瘤,然后选择生产与免疫标志物特异性结合的抗体的杂交瘤,使其增殖,从培养上清中获得抗免疫标志物单克隆抗体。为了使被免疫动物中抗体效价升高,免疫通常需要花费数周进行多次。本发明中,为了提高免疫标志物结合的特异性,优选单克隆抗体。

[0069] 作为免疫原使用的多肽或其部分片段可通过化学合成、遗传工程学方法等常规方法制备,或从新鲜人血浆等中提取免疫标志物并纯化获得。化学合成法的具体例子例如可举出:Fmoc法(芴甲氧羰基法)、tBoc法(叔丁氧基羰基法)等。还可以利用各种市售的肽合成仪,通过常规方法参照GenBank等数据库中的免疫标志物序列信息合成所需的多肽。通过遗传工程学方法制备多肽的方法也是周知的。具体来说,例如可通过以下所述的方法制备:首先,由来自人的培养细胞等中提取RNA,通过反转录反应由mRNA合成cDNA。以该cDNA为模板,根据GenBank等数据库中的免疫标志物序列信息等设计引物并进行PCR,制备编码免疫标志物的多核苷酸。或者,编码免疫标志物的多核苷酸可通过使用市售的核酸合成仪的常规方法制备。编码各氨基酸的密码子是公知的,因此只要特定氨基酸序列,编码该氨基酸序列的多核苷酸的碱基序列也可确定。接着,将制备的多核苷酸导入适当的载体,通过适当的表达系统使多肽表达,回收该多肽,由此可获得所需的免疫原多肽。所使用的载体或各种表达系统(细菌表达系统、酵母细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统、昆虫细胞表达系统、无细胞表达系统等)也是周知的,各种载体或宿主细胞、试剂类、检测试剂盒均有市售。

[0070] 免疫分析法是周知的常规方法。作为具体例子,可举出竞争蛋白结合分析、受体结合分析,以及放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析、胶体金免疫分析、化学发光和生物发光免疫分析方法等,本发明中可以采用任意方法。从免疫检测的准确性及安全性等角度考虑,可优选使用荧光免疫分析法。

[0071] 磁微粒即超顺磁性纳米颗粒,磁微粒分离免疫荧光分析技术是将目标分子的亲和基团如抗体、蛋白等偶联于磁性纳米颗粒表面,形成可均匀分散的具有高度稳定性的胶态复合磁微粒。当免疫磁微粒与含有检测目标分子的溶液混合后,由于目标分子与其基团的亲和结合而形成磁微粒-基团-目标分子复合物,然后利用外加磁场(磁力架或磁棒)与磁微粒之间的磁性将磁微粒-基团-目标分子复合物分离,经过洗涤缓冲液去除非特异性结合杂质,然后用洗脱液将目标分子与磁微粒分离,进而实现目标分子的分离检测,具有成本低、能耗少、安全无毒、可回收等优点,若与全自动分离检测仪器配套使用,可进一步提高反应通量和工作效率。本发明在粒径分布于100~1000nm之间的磁微粒表面或通过磁微粒表面的功能基团(氨基、羧基、巯基、环氧基、NHS基团等)偶联免疫标志物和与免疫标志物特异性结合的抗免疫标志物抗体,作为固相载体用于免疫检测。本发明中的磁微粒表面可以使用任意一种功能基团与免疫标志物或者抗免疫标志物抗体偶联。悬浮性磁微粒作为固相载体,取代传统的免疫学固相载体用于检测,具有较大的比表面积,能够充分的与样品反应,加之外加磁场的灵活运用,具有快速高效、灵敏度高、重复性好等优点。另外,这些磁微粒也存在市售商品,因此也可以使用市售的磁微粒或者磁珠。

[0072] 以使用抗免疫标志物抗体作为包被抗体的情形为例,具体说明本发明的免疫标志物检测方法。首先,将抗免疫标志物抗体(包被抗体)偶联于固相载体磁微粒上,将多余的基团封闭后使足量磁微粒与待测样品充分接触,由此磁微粒上的抗免疫标志物抗体与样品中所含的免疫标志物特异性结合,接着磁性分离,用适当的缓冲液洗涤磁微粒复合物,除去未结合的样品中其他成分,例如多余的载体等。然后洗脱免疫标志物,使用过量的荧光素标记的抗免疫标志物抗体与免疫标志物结合,孵育使充分反应。反应结束后,用适当的方法检测来自荧光素标记物的荧光信号,由此可检测样品中的免疫标志物含量。

[0073] 固相载体没有特别限定,可以与在公知的免疫检测系统中使用的固相载体相同。固相载体的材质的具体例子可举出:聚苯乙烯、聚氯乙烯、琼脂糖、脂质体、膜载体、高分子磁微粒等,但并不限于这些。所使用的固相载体优选为抗体与其表面结合牢固,且可容易地将检测中形成的免疫复合物与未反应的成分分离的材料。从操作性、经济性、安全性与结合效率等方面考虑,优选使用如上所述材质中的磁微粒。

[0074] 免疫标志物、与免疫标志物特异性结合的抗免疫标志物抗体或其抗原结合性片段与固相载体的结合可通过本领域周知的常规方法进行,作为具体例子,可举出共价键化学偶联、非共价键吸附或物理吸附等,本发明可以采用任意一种方式结合到固相载体表面,但并不限于这些。

[0075] 一种磁微粒,其特征在于:所述磁微粒表面覆盖有一层具有抗原识别活性的抗体,或覆盖有一层具有抗体识别活性的抗原。

[0076] 标记物没有特别限定,可以使用与在公知的免疫检测系统中使用的标记物同样的物质。具体例子可举出:酶、荧光物质、化学发光物质、染色物质、放射性物质等。为了提高检测灵敏度,简化操作步骤,降低放射污染,优选使用荧光素标记。用于标记的荧光染料也没有特别限定,可以使用与在公知的免疫荧光检测系统中使用的标记物同样的物质,具体例子可举出:异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC),四乙基罗丹明(rhodamine, RB200),四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TRITC),镧系元素(铕 Eu_3 、铽 Tb_3 、铈 Ce_3 等)螯合物,藻红蛋白(phycoerythrin, PE)及其他荧光物质(β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)等。本发明中可以使用任意一种作为荧光染料,但并不限于这些。

[0077] 使用生物素作为标记物时,可以使用结合了酶、荧光物质、化学发光物质、染色物质或放射性物质等的链霉抗生物素或半抗原抗体等检测。

[0078] 信号的检测可根据标记物的种类适当选择。例如信号如果是显色,则可使用比色计或吸光光度计,如果是荧光则可以使用荧光分光光度计,如果是发光则可以使用光子计数器,如果是放射线则可以使用放射线检测装置。对于以各种浓度含有免疫标志物的浓度已知的标准样品,按照本发明的方法检测免疫标志物,由来自标记的信号量和标准样品中免疫标志物的浓度的相关关系制图,绘制标准曲线,对免疫标志物浓度未知的样品同样进行检测操作,检测来自标记的信号量,将检测值代入该标准曲线,由此可对样品中免疫标志物进行定量。

[0079] 本发明的方法所适用的样品是从受试者体内分离的样品,优选血液样品,特别优选血浆或血清。根据本发明的检测方法,不管是血浆还是血清,均可稳定地检测免疫标志物含量。根据需要可适当稀释样品,以确保在工作浓度范围内进行检测。

[0080] 本免疫标志物磁微粒免疫荧光检测方法所述抗体不是包被在板上,而是用抗体来包被磁微粒,将包被的磁微粒作为试剂使用,更利于定量操作,方便稳定且灵敏度更高,在抗体抗原反应中能将检测干扰因素降到最低。

[0081] 本发明还提供免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂,该试剂包含:磁微粒,免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液。

[0082] 上述免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂可以适当组合,作为免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂盒提供。免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂还可以与其它试剂类等适当组合,例如,除上述检测试剂之外,本发明的检测试剂盒中还可以进一步含有EP管、样本稀释液等。其中,EP管即Eppendorf离心管,为市售商品,可按照常规方法购买获得。免疫检测所必需的其它试剂类是周知的。

[0083] 本发明所提供的灵敏快速的免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂盒,为免疫标志物的检测和疾病的早期诊断提供了一种简便快速,高灵敏度,高准确性,安全无毒,可回收的途径。检测试剂盒中包括所述免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂,固定在盒内的凹槽中。

附图说明

[0084] 图1是表示实施例1中DCP标准品浓度与吸光度的线性关系的图表,

[0085] 图2是表示实施例1中AFP-L3标准品浓度与吸光度的线性关系的图表,

[0086] 图3是表示实施例1中GP73标准品浓度与吸光度的线性关系的图表。

具体实施方式

[0087] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,以使用DCP,AFP-L3,GP73作为目标检测物的情形为例,具体说明本发明的免疫标志物磁微粒免疫荧光检测方法。本发明并不受这些实施例等的限定。本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0088] 在本发明中,当给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0089] 实施例1.DCP磁微粒分离免疫荧光分析检测试剂的制备

[0090] 1、DCP抗原的制备

[0091] (1)pCold II -DCP表达载体的构建

[0092] 参照GenBank中人DCP的基因序列设计引物并合成DCP基因,PCR扩增后,1%琼脂糖凝胶电泳检测DCP扩增产物,切下目的条带,使用胶回收试剂盒回收目的片段。对其用限制性内切酶NdeI和HindIII双酶切的原核表达载体pCold II连接,转化至大肠杆菌E.coli.DH5α

中扩增,再转入E.coli.BL21(DE3)感受态细胞,接种于LB固体培养基中,含氨苄青霉素(Amp)100mg/L,抽取质粒,进行NdeI和HindIII酶切鉴定和测序。重组质粒pCold II-DCP经5'NdeI和3'HindIII进行双酶切,出现两条特异性条带,位置与pCold II和目的片段的大小一致。测序结果显示目标序列与NCBI相应序列相符,证实表达载体pCold II-DCP构建成功。

[0093] (2)DCP融合蛋白的表达及纯化

[0094] 挑取含重组质粒pCold II-DCP-BL21的菌落接种于10mL LB培养基(Amp,100mg/L)中,220r/min 37℃摇菌12h,按1:100的比例接种于1000mL的LB培养基(Amp,100mg/L)中,相同条件下培养3h,待菌液达到A₆₀₀时加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,15℃振荡培养16h,诱导培养结束后,收集菌体至50mL无菌离心管,5000r/min 4℃离心10min,弃上清,重悬于20mL lysis buffer(20mmol/L Tris-HCl包含1mmol/L蛋白酶抑制剂混合物,pH 8.0)中,经细胞超声破碎仪破碎(超声2s、冷却4s、功率100W),12000r/min、4℃离心15min。沉淀重悬于lysis buffer(含8mol/L尿素),并经0.22μm滤膜过滤,过Ni-NTA层析柱进行纯化;10倍的柱体积lysis buffer(含8mol/L尿素+20mmol/L咪唑)洗涤;用buffer C(20mmol/L Tris-HCl buffer,pH 8.0,含150mmol/L NaCl,8mol/L尿素,250mmol/L咪唑)洗脱目的蛋白。将洗脱的蛋白用含有一定浓度梯度的尿素(6、5、4、2、1mol/L)进行复性,最终用PBS透析,透析完成后检测冻干浓缩蛋白浓度为1.5mg/mL。

[0095] 2、DCP抗体的制备

[0096] (1)杂交瘤细胞株的制备

[0097] 将生长状态良好的S p2/0骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞以1:10的比例混合,加入50%聚乙二醇进行融合,融合过程按常规方法进行。用DCP表达蛋白作为检测抗原,对有融合细胞孔的上清液进行间接ELISA检测,一抗为细胞培养上清,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(1:2000稀释),TMB显色检测筛选阳性细胞克隆株。将筛选的阳性细胞克隆株用有限稀释法进行单克隆筛选,间接ELISA法检测,直至阳性率达100%,筛选出稳定分泌抗DCP抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养,并冻存于液氮中。

[0098] (2)单克隆抗体的制备

[0099] 选择BALb/c小鼠,每只腹腔注射灭菌液体石蜡0.5mL,1周后经腹腔接种杂交瘤细胞0.5mL(1×10^6 细胞/只)。10~14d后小鼠腹部明显肿胀收集腹水,12000r/min离心10min,去除上层的脂肪、液体石蜡和沉淀,吸取淡黄色腹水,将腹水经Protein A琼脂糖亲和层析柱获得纯化抗体,之后在PBS中进行4℃透析12h,隔日采用BCA法检测抗体浓度,ELISA法检测抗体效价,然后加入50%甘油混合,小量分装后-80℃保存备用。

[0100] DCP磁微粒免疫荧光分析检测方法及操作步骤

[0101] 1、磁微粒与目标生物样品的偶联

[0102] (1)磁微粒的预处理

[0103] 将磁微粒悬浮液反复颠倒混匀,取50μL置于1.5mL EP管中,加入0.5~1.0mL洗涤缓冲液,洗涤缓冲液为:pH为7.2~7.6的20mM磷酸钠,150mM氯化钠,混匀,然后在磁力架上磁性分离,弃上清液。加入1mL洗涤缓冲液悬浮磁微粒,混匀,在磁力架上磁性分离,弃上清液。重复上一步骤,然后将磁微粒在50μL偶联缓冲液中悬浮,偶联缓冲液为:pH为8.0~8.2的25mM~50mM碳酸氢铵,待用。

[0104] (2)目标生物样品的偶联

[0105] 将目标生物样品与磁微粒偶联以制备免疫磁微粒时,所用的单克隆抗体或抗原包被液的浓度是影响后期检测的直接因素,其浓度大小直接影响检测结果的准确性和线性范围。若所用包被液的浓度过低,在后期的免疫反应中磁微粒的反应效率差,抗原抗体反应不完全,使检测结果偏低;若所用包被液的浓度过高,会造成昂贵试剂的浪费。因此采用以下方法进行条件优化筛选:

[0106] 取10~15 μ L需偶联的DCP抗体或抗原于盛有2mL粒径为100~1000nm磁微粒的EP管中,并加入500 μ L偶联缓冲液,偶联缓冲液为:pH为8.0~8.2的25mM~50mM碳酸氢铵,混匀。将EP管置于旋转混合仪上孵育。然后将EP管置于磁力架上磁性分离,保留磁微粒及上清液,采用BCA法检测偶联前后抗DCP抗体标准溶液的蛋白含量。所述磁微粒与抗DCP抗体偶联条件优选为:

[0107] 磁微粒粒径120nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;

[0108] 磁微粒粒径180nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;

[0109] 磁微粒粒径200nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;

[0110] 磁微粒粒径300nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;

[0111] 磁微粒粒径500nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;

[0112] 或者磁微粒粒径800nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。

[0113] 所述磁微粒与抗DCP抗原偶联条件优选为:

[0114] 磁微粒粒径120nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;

[0115] 磁微粒粒径180nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;

[0116] 磁微粒粒径200nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;

[0117] 磁微粒粒径300nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;

[0118] 磁微粒粒径500nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;

[0119] 或者磁微粒粒径800nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。

[0120] (3)封闭未反应的基团

[0121] 磁微粒偶联结束后,加入500 μ L封闭液,封闭液为:0.1%的BSA,混匀后将EP管置于旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h,然后将EP管置于磁力架上磁性分离,弃上清液。重复上一步骤一次。

[0122] (4)磁微粒的保存

[0123] 向已完成生物分子共价偶联的磁微粒中加入1mL的保存液,保存液为:pH为9的5mM BST缓冲液,0.05% Tween-20,0.01% NaN₃,0.1% BSA,混匀,于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0124] 2、磁微粒与抗DCP抗体偶联效率的检测

[0125] 将抗DCP抗体与磁微粒偶联后,采用BCA法检测偶联前后抗DCP抗体标准溶液的蛋白含量,计算磁微粒偶联效率。结果表明,加入磁微粒后,溶液蛋白浓度显著降低,磁微粒表面的基团可与抗DCP抗体发生偶联,以使磁微粒具有生物活性,即具有捕获抗体或抗原的能力成为免疫磁微粒。磁微粒与抗DCP抗体偶联效率为84.78% \pm 7.23。

[0126] 3、DCP标准曲线的绘制

[0127] 取FITC标记的抗DCP抗体100 μ L于EP管中,分别加入DCP标准品各100 μ L,用0.01mol/L PBS稀释为10个浓度梯度(0ng/mL,0.2ng/mL,0.4ng/mL,0.8ng/mL,1.6ng/mL,3.2ng/mL,6.4ng/mL,12.8ng/mL,25.6ng/mL,51.2ng/mL),于室温旋转孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵

酸,充分反应后置于磁力架上磁性分离,立即用洗涤缓冲液清洗磁微粒,洗涤缓冲液为:pH为7.2~7.6的20mM磷酸钠,150mM氯化钠,除去残留于磁微粒表面的抗体或抗原,然后加入1mL保存液,保存液为:pH为9的5mM BST缓冲液,0.05% Tween-20,0.01% NaN₃,0.1% BSA,混匀,于4℃保存备用。将抗DCP抗体与回收的磁微粒偶联后,采用BCA法检测偶联前后抗DCP抗体标准溶液的蛋白含量,计算得磁微粒回收率为83.99%±8.14。

[0142] 7、全自动磁微粒分离免疫荧光分析检测

[0143] 磁微粒分离检测的具体实现方法通常有手动和自动两种形式。手动检测是指操作人员使用DCP磁微粒免疫荧光检测试剂、磁力架等耗材和工具,手工完成整个检测流程。手动分选中用到的磁力架结构比较简单,主要由支架和产生磁场的永磁铁组成,起到承托试管并提供外加磁场的作用。磁微粒的孵育、外部磁场的加入与移除、吸附物的清洗与洗脱等各关键步骤都由人工操作完成。手动分选不需要复杂的设备,形式灵活、成本较低,适合少量实验使用。

[0144] 当需要频繁进行操作且样本量较大时,采用自动分离检测法更为方便高效。自动分离法主要利用全自动磁微粒分选仪,操作人员将待分选样本加入到分选仪中,由分选仪自动完成分离流程。全自动磁性分选仪的分选通量较大,并且一般有多个优化的分选程序可供调用,操作简单,分选可靠性高。当前具有代表性的产品化全自动磁性分选仪有美天旎(MACS),BD,R&D,StemCell RoboSep和Dyna1 Bead Retriever等品牌。

[0145] 本发明磁微粒分离免疫荧光分析DCP含量的检测方法,可用于全自动免疫磁珠分选系统,实现全自动分析检测,具体操作步骤如下:

[0146] (1)预冲autoMACS pro分选仪,准备待测血清样品、磁微粒A/B、DCP标准品、FITC标记的抗DCP抗体、偶联缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱液、封闭液、保存液;

[0147] (2)细胞分选策略选择“阳性分选策略”,标记方式选择“直接标记”;

[0148] (3)取25μL DCP标准品到S1-7号管中,向2个空白管中加入1mL洗涤缓冲液,向离心管中分别加入25μL磁微粒A和50μL荧光标记抗DCP抗体,设置反应程序条件,上机检测。将检测结果与手动检测法进行对照,结果显示二者具有良好的相关性。

[0149] 实施例2.AFP-L3磁微粒分离免疫荧光分析检测试剂的制备

[0150] 1、AFP-L3抗原的制备

[0151] (1)pCold II -AFP-L3表达载体的构建

[0152] 参照GenBank中人AFP-L3的基因序列设计引物并合成AFP-L3基因,PCR扩增后,1%琼脂糖凝胶电泳检测AFP-L3扩增产物,切下目的条带,使用胶回收试剂盒回收目的片段。对其用限制性内切酶NdeI和HindIII双酶切的原核表达载体pCold II连接,转化至大肠杆菌E.coli.DH5α中扩增,再转入E.coli.BL21(DE3)感受态细胞,接种于LB固体培养基中,含氨苄青霉素(Amp)100mg/L,抽取质粒,进行NdeI和HindIII酶切鉴定和测序。重组质粒pCold II -AFP-L3经5'NdeI和3'HindIII进行双酶切,出现两条特异性条带,位置与pCold II和目的片段的大小一致。测序结果显示目标序列与NCBI相应序列相符,证实表达载体pCold II -AFP-L3构建成功。

[0153] (2)AFP-L3融合蛋白的表达及纯化

[0154] 挑取含重组质粒pCold II -AFP-L3-BL21的菌落接种于10mL LB培养基(Amp,100mg/L)中,220r/min 37℃摇菌12h,按1:100的比例接种于1000mL的LB培养基(Amp,100mg/L)中,

相同条件下培养3h,待菌液达到 A_{600} 时加入IPTG至终浓度为 0.5mmol/L , 15°C 振荡培养16h,诱导培养结束后,收集菌体至50mL无菌离心管, 5000r/min 4°C 离心10min,弃上清,重悬于20mL lysis buffer(20mmol/L Tris-HCl包含 1mmol/L 蛋白酶抑制剂混合物,pH 8.0)中,经细胞超声破碎仪破碎(超声2s、冷却4s、功率100W), 12000r/min 、 4°C 离心15min。沉淀重悬于lysis buffer(含 8mol/L 尿素),并经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤,过Ni-NTA层析柱进行纯化;10倍的柱体积lysis buffer(含 8mol/L 尿素+ 20mmol/L 咪唑)洗涤;用buffer C(20mmol/L Tris-HCl buffer,pH 8.0,含 150mmol/L NaCl, 8mol/L 尿素, 250mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白。将洗脱的蛋白用含有一定浓度梯度的尿素($6,5,4,2,1\text{mol/L}$)进行复性,最终用PBS透析,透析完成后检测冻干浓缩蛋白浓度为 1.5mg/mL 。

[0155] 2、AFP-L3抗体的制备

[0156] (1)杂交瘤细胞株的制备

[0157] 将生长状态良好的S p2/0骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞以1:10的比例混合,加入50%聚乙二醇进行融合,融合过程按常规方法进行。用AFP-L3表达蛋白作为检测抗原,对有融合细胞孔的上清液进行间接ELISA检测,一抗为细胞培养上清,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(1:2000稀释),TMB显色检测筛选阳性细胞克隆株。将筛选的阳性细胞克隆株用有限稀释法进行单克隆筛选,间接ELISA法检测,直至阳性率达100%,筛选出稳定分泌抗AFP-L3抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养,并冻存于液氮中。

[0158] (2)单克隆抗体的制备

[0159] 选择BALb/c小鼠,每只腹腔注射灭菌液体石蜡 0.5mL ,1周后经腹腔接种杂交瘤细胞 0.5mL (1×10^6 细胞/只)。10~14d后小鼠腹部明显肿胀收集腹水, 12000r/min 离心10min,去除上层的脂肪、液体石蜡和沉淀,吸取淡黄色腹水,将腹水经Protein A琼脂糖亲和层析柱获得纯化抗体,之后在PBS中进行 4°C 透析12h,隔日采用BCA法检测抗体浓度,ELISA法检测抗体效价,然后加入50%甘油混合,小量分装后 -80°C 保存备用。

[0160] AFP-L3磁微粒免疫荧光分析检测方法及操作步骤

[0161] 1、磁微粒与目标生物样品的偶联

[0162] (1)磁微粒的预处理

[0163] 将磁微粒悬浮液反复颠倒混匀,取 $50\mu\text{L}$ 置于 1.5mL EP管中,加入 $0.5\sim 1.0\text{mL}$ 洗涤缓冲液,洗涤缓冲液为:pH为 $7.2\sim 7.6$ 的 20mM 磷酸钠, 150mM 氯化钠,混匀,然后在磁力架上磁性分离,弃上清液。加入 1mL 洗涤缓冲液悬浮磁微粒,混匀,在磁力架上磁性分离,弃上清液。重复上一步骤,然后将磁微粒在 $50\mu\text{L}$ 偶联缓冲液中悬浮,偶联缓冲液为:pH为 $8.0\sim 8.2$ 的 $25\text{mM}\sim 50\text{mM}$ 碳酸氢铵,待用。

[0164] (2)目标生物样品的偶联

[0165] 将目标生物样品与磁微粒偶联以制备免疫磁微粒时,所用的单克隆抗体或抗原包被液的浓度是影响后期检测的直接因素,其浓度大小直接影响检测结果的准确性和线性范围。若所用包被液的浓度过低,在后期的免疫反应中磁微粒的反应效率差,抗原抗体反应不完全,使检测结果偏低;若所用包被液的浓度过高,会造成昂贵试剂的浪费。因此采用以下方法进行条件优化筛选:

[0166] 取 $10\sim 15\mu\text{L}$ 需偶联的AFP-L3抗体或抗原于盛有 2mL 粒径为 $100\sim 1000\text{nm}$ 磁微粒的EP管中,并加入 $500\mu\text{L}$ 偶联缓冲液,偶联缓冲液为:pH为 $8.0\sim 8.2$ 的 $25\text{mM}\sim 50\text{mM}$ 碳酸氢铵,混

匀。将EP管置于旋转混合仪上孵育。然后将EP管置于磁力架上磁性分离,保留磁微粒及上清液,采用BCA法检测偶联前后抗AFP-L3抗体标准溶液的蛋白含量。所述磁微粒与抗AFP-L3抗体偶联条件优选为:

- [0167] 磁微粒粒径120nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;
- [0168] 磁微粒粒径180nm、抗体浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;
- [0169] 磁微粒粒径200nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;
- [0170] 磁微粒粒径300nm、抗体浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;
- [0171] 磁微粒粒径500nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;
- [0172] 或者磁微粒粒径800nm、抗体浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。
- [0173] 所述磁微粒与抗AFP-L3抗原偶联条件优选为:
- [0174] 磁微粒粒径120nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=11;
- [0175] 磁微粒粒径180nm、抗原浓度20 μ g/mL、22 $^{\circ}$ C孵育2h、pH=10;
- [0176] 磁微粒粒径200nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=11;
- [0177] 磁微粒粒径300nm、抗原浓度25 μ g/mL、25 $^{\circ}$ C孵育4h、pH=10;
- [0178] 磁微粒粒径500nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=11;
- [0179] 或者磁微粒粒径800nm、抗原浓度30 μ g/mL、28 $^{\circ}$ C孵育6h、pH=10。

[0180] (3)封闭未反应的基团

[0181] 磁微粒偶联结束后,加入500 μ L封闭液,封闭液为:0.1%的BSA,混匀后将EP管置于旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h,然后将EP管置于磁力架上磁性分离,弃上清液。重复上一步骤一次。

[0182] (4)磁微粒的保存

[0183] 向已完成生物分子共价偶联的磁微粒中加入1mL的保存液,保存液为:pH为9的5mM BST缓冲液,0.05% Tween-20,0.01% NaN₃,0.1% BSA,混匀,于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0184] 2、磁微粒与抗AFP-L3抗体偶联效率的检测

[0185] 将抗AFP-L3抗体与磁微粒偶联后,采用BCA法检测偶联前后抗AFP-L3抗体标准溶液的蛋白含量,计算磁微粒偶联效率。结果表明,加入磁微粒后,溶液蛋白浓度显著降低,磁微粒表面的基团可与抗AFP-L3抗体发生偶联,以使磁微粒具有生物活性,即具有捕获抗体或抗原的能力成为免疫磁微粒。磁微粒与抗AFP-L3抗体偶联效率为78.43% \pm 4.25。

[0186] 3、AFP-L3标准曲线的绘制

[0187] 取FITC标记的抗AFP-L3抗体100 μ L于EP管中,分别加入AFP-L3标准品各100 μ L,用0.01mol/L PBS稀释为7个浓度梯度(0ng/mL,1.25ng/mL,2.50ng/mL,5.00ng/mL,10.00ng/mL,20.00ng/mL,40.00ng/mL),于室温旋转孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h,使AFP-L3抗原抗体充分反应。用空白孔调零,采用荧光分光光度计检测标准品荧光值,依据AFP-L3标准品浓度及其荧光值绘制标准曲线,见图2。

[0188] 4、AFP-L3含量的检测

[0189] 具体操作步骤如下:

[0190] (1)取10份人血清样品200 μ L,加入2mL偶联AFP-L3抗体的磁微粒A,于室温旋转孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h,使AFP-L3抗原抗体充分反应。

[0191] (2)置于磁力架上磁性分离,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗磁微粒复合物,洗涤缓

冲液为:pH为7.2~7.6的20mM磷酸钠,150mM氯化钠,置于磁力架上磁性分离,弃上清液。

[0192] (3)加入100 μ L洗脱液,洗脱液为:pH为2.5的0.1M甘氨酸,混匀,重悬磁微粒,室温孵育5min,置于磁力架上磁性分离,保留上清液。

[0193] (4)加入2mL FITC标记的抗AFP-L3抗体,于室温旋转孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h。加入20mL偶联AFP-L3抗原的磁微粒,于室温旋转孵育2~6h或者4 $^{\circ}$ C孵育12~20h。

[0194] (5)置于磁力架上磁性分离,保留上清液,采用荧光分光光度计检测样品荧光值,并对照标准曲线计算样品中AFP-L3含量。

[0195] 实施例3.GP73磁微粒分离免疫荧光分析检测试剂的制备

[0196] 1、GP73抗原的制备

[0197] (1)pCold II -GP73表达载体的构建

[0198] 参照GenBank中人GP73的基因序列设计引物并合成GP73基因,PCR扩增后,1%琼脂糖凝胶电泳检测GP73扩增产物,切下目的条带,使用胶回收试剂盒回收目的片段。对其用限制性内切酶Nde I和Hind III双酶切的原核表达载体pCold II连接,转化至大肠杆菌E.coli.DH5 α 中扩增,再转入E.coli.BL21(DE3)感受态细胞,接种于LB固体培养基中,含氨苄青霉素(Amp)100mg/L,抽取质粒,进行Nde I和Hind III酶切鉴定和测序。重组质粒pCold II -GP73经5'Nde I和3'Hind III进行双酶切,出现两条特异性条带,位置与pCold II和目的片段的大小一致。测序结果显示目标序列与NCBI相应序列相符,证实表达载体pCold II -GP73构建成功。

[0199] (2)GP73融合蛋白的表达及纯化

[0200] 挑取含重组质粒pCold II -GP73-BL21的菌落接种于10mL LB培养基(Amp,100mg/L)中,220r/min 37 $^{\circ}$ C摇菌12h,按1:100的比例接种于1000mL的LB培养基(Amp,100mg/L)中,相同条件下培养3h,待菌液达到A₆₀₀时加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,15 $^{\circ}$ C振荡培养16h,诱导培养结束后,收集菌体至50mL无菌离心管,5000r/min 4 $^{\circ}$ C离心10min,弃上清,重悬于20mL lysis buffer(20mmol/L Tris-HCl包含1mmol/L蛋白酶抑制剂混合物,pH 8.0)中,经细胞超声破碎仪破碎(超声2s、冷却4s、功率100W),12000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min。沉淀重悬于lysis buffer(含8mol/L尿素),并经0.22 μ m滤膜过滤,过Ni-NTA层析柱进行纯化;10倍的柱体积lysis buffer(含8mol/L尿素+20mmol/L咪唑)洗涤;用buffer C(20mmol/L Tris-HCl buffer,pH 8.0,含150mmol/L NaCl,8mol/L尿素,250mmol/L咪唑)洗脱目的蛋白。将洗脱的蛋白用含有一定浓度梯度的尿素(6、5、4、2、1mol/L)进行复性,最终用PBS透析,透析完成后检测冻干浓缩蛋白浓度为1.5mg/mL。

[0201] 2、GP73抗体的制备

[0202] (1)杂交瘤细胞株的制备

[0203] 将生长状态良好的S p2/0骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞以1:10的比例混合,加入50%聚乙二醇进行融合,融合过程按常规方法进行。用GP73表达蛋白作为检测抗原,对有融合细胞孔的上清液进行间接ELISA检测,一抗为细胞培养上清,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(1:2000稀释),TMB显色检测筛选阳性细胞克隆株。将筛选的阳性细胞克隆株用有限稀释法进行单克隆筛选,间接ELISA法检测,直至阳性率达100%,筛选出稳定分泌抗GP73抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养,并冻存于液氮中。

[0204] (2)单克隆抗体的制备

[0205] 选择BALB/c小鼠, 每只腹腔注射灭菌液体石蜡0.5mL, 1周后经腹腔接种杂交瘤细胞0.5mL(1×10^6 细胞/只)。10~14d后小鼠腹部明显肿胀收集腹水, 12000r/min离心10min, 去除上层的脂肪、液体石蜡和沉淀, 吸取淡黄色腹水, 将腹水经Protein A琼脂糖亲和层析柱获得纯化抗体, 之后在PBS中进行4℃透析12h, 隔日采用BCA法检测抗体浓度, ELISA法检测抗体效价, 然后加入50%甘油混合, 小量分装后-80℃保存备用。

[0206] GP73磁微粒免疫荧光分析检测方法操作步骤

[0207] 1、磁微粒与目标生物样品的偶联

[0208] (1)磁微粒的预处理

[0209] 将磁微粒悬浮液反复颠倒混匀, 取50μL置于1.5mL EP管中, 加入0.5~1.0mL洗涤缓冲液, 洗涤缓冲液为:pH为7.2~7.6的20mM磷酸钠, 150mM氯化钠, 混匀, 然后在磁力架上磁性分离, 弃上清液。加入1mL洗涤缓冲液悬浮磁微粒, 混匀, 在磁力架上磁性分离, 弃上清液。重复上一步骤, 然后将磁微粒在50μL偶联缓冲液中悬浮, 偶联缓冲液为:pH为8.0~8.2的25mM~50mM碳酸氢铵, 待用。

[0210] (2)目标生物样品的偶联

[0211] 将目标生物样品与磁微粒偶联以制备免疫磁微粒时, 所用的单克隆抗体或抗原包被液的浓度是影响后期检测的直接因素, 其浓度大小直接影响检测结果的准确性和线性范围。若所用包被液的浓度过低, 在后期的免疫反应中磁微粒的反应效率差, 抗原抗体反应不完全, 使检测结果偏低; 若所用包被液的浓度过高, 会造成昂贵试剂的浪费。因此采用以下方法进行条件优化筛选:

[0212] 取10~15μL需偶联的GP73抗体或抗原于盛有2mL粒径为100~1000nm磁微粒的EP管中, 并加入500μL偶联缓冲液, 偶联缓冲液为:pH为8.0~8.2的25mM~50mM碳酸氢铵, 混匀。将EP管置于旋转混合仪上孵育。然后将EP管置于磁力架上磁性分离, 保留磁微粒及上清液, 采用BCA法检测偶联前后抗GP73抗体标准溶液的蛋白含量。所述磁微粒与抗GP73抗体偶联条件优选为:

[0213] 磁微粒粒径120nm、抗体浓度20μg/mL、22℃孵育2h、pH=11;

[0214] 磁微粒粒径180nm、抗体浓度20μg/mL、22℃孵育2h、pH=10;

[0215] 磁微粒粒径200nm、抗体浓度25μg/mL、25℃孵育4h、pH=11;

[0216] 磁微粒粒径300nm、抗体浓度25μg/mL、25℃孵育4h、pH=10;

[0217] 磁微粒粒径500nm、抗体浓度30μg/mL、28℃孵育6h、pH=11;

[0218] 或者磁微粒粒径800nm、抗体浓度30μg/mL、28℃孵育6h、pH=10。

[0219] 所述磁微粒与抗GP73抗原偶联条件优选为:

[0220] 磁微粒粒径120nm、抗原浓度20μg/mL、22℃孵育2h、pH=11;

[0221] 磁微粒粒径180nm、抗原浓度20μg/mL、22℃孵育2h、pH=10;

[0222] 磁微粒粒径200nm、抗原浓度25μg/mL、25℃孵育4h、pH=11;

[0223] 磁微粒粒径300nm、抗原浓度25μg/mL、25℃孵育4h、pH=10;

[0224] 磁微粒粒径500nm、抗原浓度30μg/mL、28℃孵育6h、pH=11;

[0225] 或者磁微粒粒径800nm、抗原浓度30μg/mL、28℃孵育6h、pH=10。

[0226] (3)封闭未反应的基团

[0227] 磁微粒偶联结束后, 加入500μL封闭液, 封闭液为:0.1%的BSA, 混匀后将EP管置于

旋转混合仪上室温孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,然后将EP管置于磁力架上磁性分离,弃上清液。重复上一步骤一次。

[0228] (4)磁微粒的保存

[0229] 向已完成生物分子共价偶联的磁微粒中加入1mL的保存液,保存液为:pH为9的5mM BST缓冲液,0.05%Tween-20,0.01%NaN₃,0.1%BSA,混匀,于4℃保存备用。

[0230] 2、磁微粒与抗GP73抗体偶联效率的检测

[0231] 将抗GP73抗体与磁微粒偶联后,采用BCA法检测偶联前后抗GP73抗体标准溶液的蛋白含量,计算磁微粒偶联效率。结果表明,加入磁微粒后,溶液蛋白浓度显著降低,磁微粒表面的基团可与抗GP73抗体发生偶联,以使磁微粒具有生物活性,即具有捕获抗体或抗原的能力成为免疫磁微粒。磁微粒与抗GP73抗体偶联效率为77.69%±5.36。

[0232] 3、GP73标准曲线的绘制

[0233] 取FITC标记的抗GP73抗体100μL于EP管中,分别加入GP73标准品各100μL,用0.01mol/L PBS稀释为7个浓度梯度(0ng/mL,6.25ng/mL,12.50ng/mL,25.00ng/mL,50.00ng/mL,100.00ng/mL,200.00ng/mL),于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,使GP73抗原抗体充分反应。用空白孔调零,采用荧光分光光度计检测标准品荧光值,依据GP73标准品浓度及其荧光值绘制标准曲线,见图3。

[0234] 4、GP73含量的检测

[0235] 具体操作步骤如下:

[0236] (1)取10份人血清样品200μL,加入2mL偶联GP73抗体的磁微粒A,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h,使GP73抗原抗体充分反应。

[0237] (2)置于磁力架上磁性分离,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗磁微粒复合物,洗涤缓冲液为:pH为7.2~7.6的20mM磷酸钠,150mM氯化钠,置于磁力架上磁性分离,弃上清液。

[0238] (3)加入100μL洗脱液,洗脱液为:pH为2.5的0.1M甘氨酸,混匀,重悬磁微粒,室温孵育5min,置于磁力架上磁性分离,保留上清液。

[0239] (4)加入2mL FITC标记的抗GP73抗体,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h。加入20mL偶联GP73抗原的磁微粒,于室温旋转孵育2~6h或者4℃孵育12~20h。

[0240] (5)置于磁力架上磁性分离,保留上清液,采用荧光分光光度计检测样品荧光值,并对照标准曲线计算样品中GP73含量。

[0241] 和现有的方法相比,本发明的优点表现在:

[0242] 免疫磁微粒具有较高的表面质量比,可以结合更多的抗体或者抗原参加免疫反应;

[0243] 采用两套磁微粒分别偶联抗体及抗原,与常规的双抗体夹心法相比,本方法只需要一种对应的抗免疫标志物抗体即可完成反应,成本较低;

[0244] 采用荧光标记抗体技术,将抗原抗体反应的特异性和敏感性与显微示踪的精确性相结合,特异性强、灵敏度高、准确性好。

[0245] 实施例4.免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂盒的组成

[0246] 本发明根据本发明所述方法设计了一种试剂盒,该试剂盒可以用于免疫标志物的检测,通过使用该试剂盒,使操作简单,省时省力,避免了现用现配的繁琐,同时使操作标准化。

[0247] 因此本发明提供一种试剂盒。

[0248] 本发明的试剂盒,包括磁微粒,以及任选的以下组分:偶联免疫标志物抗体的磁微粒A,偶联免疫标志物抗原的磁微粒B,免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液,磁力架。

[0249] 本发明的另一种试剂盒,包括:偶联免疫标志物抗体的磁微粒A,偶联免疫标志物抗原的磁微粒B,以及任选的以下组分:免疫标志物抗原,抗免疫标志物抗体,荧光素,偶联缓冲液,洗涤缓冲液,洗脱液,封闭液,保存液,磁力架。

[0250] 其中所述任选为可以不选其中任一组分,也可以选择其中一或多种组分。

[0251] 本发明的试剂盒,是将不同的组分分别盛装,再一同包装在同一包装盒内,使用时根据说明书中描述的方法进行操作。

[0252] 试剂盒中,偶联缓冲液选自:碳酸氢盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、硫酸盐缓冲液的一种或多种的组合,浓度为1~100mM,pH为8.0~10.0;

[0253] 洗涤缓冲液选自:甘氨酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、氯化盐缓冲液的一种或多种的组合,浓度为2~200mM,pH为7.0~8.0;

[0254] 洗脱液选自:甘氨酸、Tris Buffer、EDTA溶液、IPTG溶液、L-谷氨酸溶液、MES Buffer的一种或多种的组合,浓度为0.01~10M,pH为2.0~3.0;

[0255] 封闭液选自:BSA、酪蛋白、甘氨酸的一种或多种的组合,浓度为0.05%~5%,pH为8.0~9.0;

[0256] 保存液选自:BST缓冲液、Tween-20、NaN₃、BSA的一种或多种的组合,浓度为1~50mM,pH为8~10。

[0257] 本发明的检测试剂盒,包括:盒体、盒体内的试剂,所述试剂为免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂,所述盒体内部设有若干试剂槽,所述试剂槽中放置盛有磁微粒的EP管,试剂盒中试剂的量可以是一人份,也可以是多人份。

[0258] 综上所述,本发明所提供的免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂盒具有良好的准确性和特异性且灵敏度高,有效克服了现有技术中的缺点且具高度产业化利用价值。

[0259] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

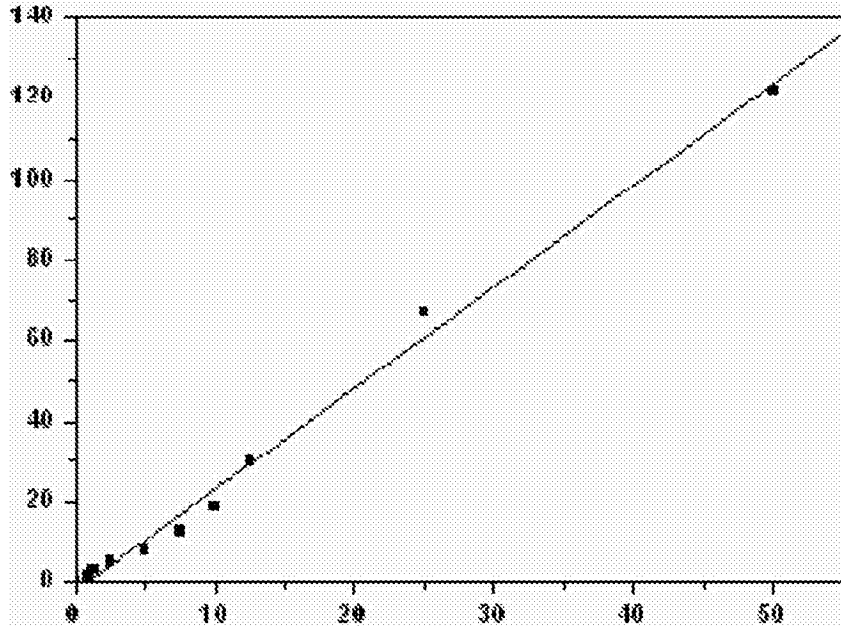


图1

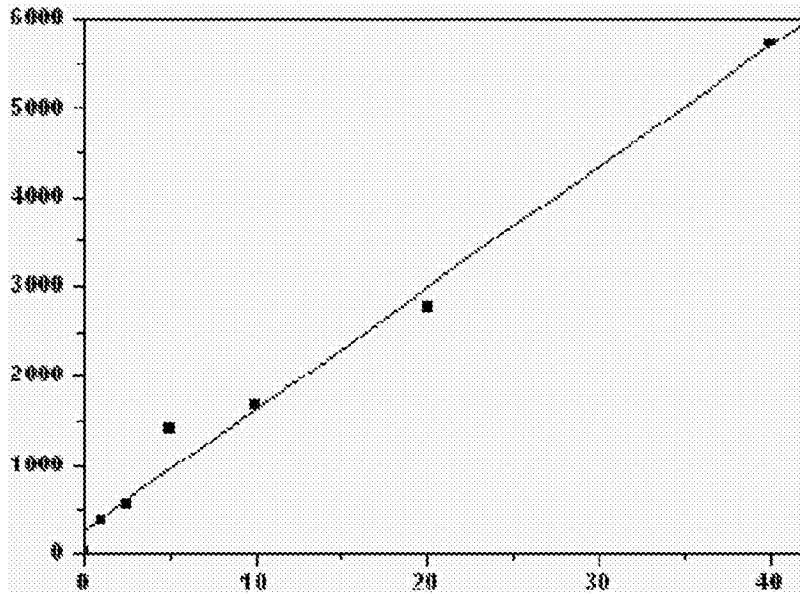


图2

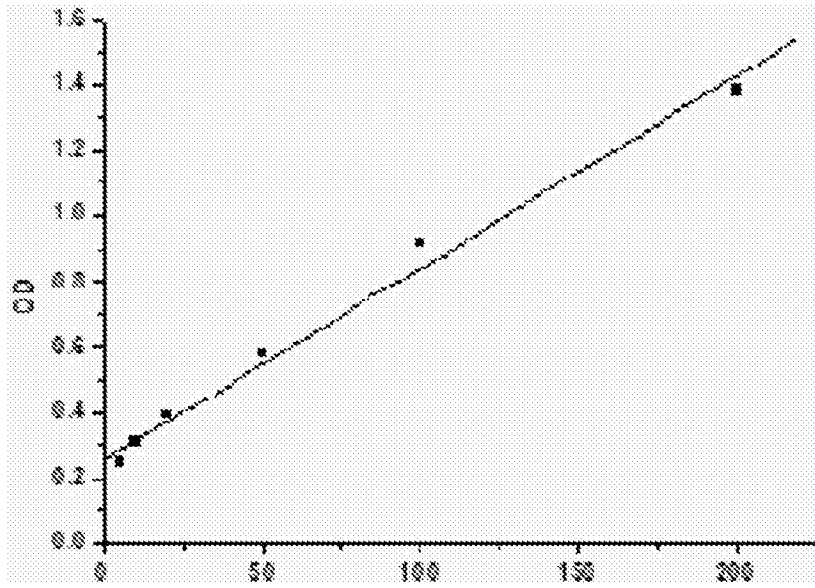


图3

专利名称(译)	一种免疫标志物的检测方法、试剂和检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106226523A	公开(公告)日	2016-12-14
申请号	CN201610519655.9	申请日	2016-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	福建广生堂药业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	福建广生堂药业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	福建广生堂药业股份有限公司		
[标]发明人	刘婕 吴文强 李国栋		
发明人	刘婕 吴文强 李国栋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/553 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/553 G01N2021/6439		
代理人(译)	孟旭 王为		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫标志物的检测方法、所用试剂和检测试剂盒，本发明的检测方法包括以下步骤：步骤1，表面偶联抗免疫标志物抗体的磁微粒A的制备，和表面偶联免疫标志物抗原的磁微粒B的制备；步骤2，荧光标记的抗免疫标志物抗体的制备；步骤3，免疫标志物含量的检测：血浆或血清样品和磁微粒A反应，反应完毕将免疫标志物洗脱，加入荧光标记的抗免疫标志物抗体孵育，再加入磁微粒B继续孵育，然后磁性分离，用荧光分光光度计检测样品荧光值，计算样品中免疫标志物含量。

