



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109991405 A

(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201711472827.2

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区蔡伦路88号五楼东面

申请人 北京科美生物技术有限公司

(72)发明人 陈英豪 赵卫国 刘宇卉 李临

其他发明人请求不公开姓名

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限

公司 11372

代理人 吴大建 方莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书3页 说明书17页

(54)发明名称

一种免疫检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域的一种免疫检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括特异性识别人免疫复合物的第一抗体;所述第一抗体能够特异性识别人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体,但不识别游离的人IgG以及游离的目标抗体。所述特异性识别人免疫复合物的第一抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体,且利用含该抗体的试剂盒实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用。

1. 一种免疫检测试剂盒,其包括能够特异性识别人免疫复合物的第一抗体;所述第一抗体能够特异性识别人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体,但不识别游离的人IgG以及游离的目标抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体通过识别表位与人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体相结合;所述识别表位为构象表位和/或线性表位。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述识别表位位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的恒定区。

4. 根据权利要求2或3所述的试剂盒,其特征在于,所述识别表位不位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的轻链部分。

5. 根据权利要求2-4中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述识别表位位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的Fc段。

6. 根据权利要求2-5中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述识别表位的氨基酸序列包含5~10个氨基酸。

7. 根据权利要求1-6中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体为多克隆抗体。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的制备方法包括:用人免疫复合物对动物进行免疫,获取含有第一抗体的动物血清;然后所述动物血清经亲和层析纯化得到特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

S1,用第一组人免疫复合物对动物进行免疫,免疫结束后,收集动物血清;

S2,将所述动物血清上样至结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱上,经洗涤、洗脱后,获得含特异性识别人免疫复合物的第一抗体的洗脱液;

S3,将所述洗脱液经透析后上样至抗人IgG亲和层析柱上,穿透液中获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱的制备方法为:将与免疫时不同的抗原固定在亲和层析柱上,然后将与所述抗原特异反应的阳性人血清上样至所述亲和层析柱上,使阳性人血清中的特异性抗体与所述抗原形成第二组人免疫复合物,获得结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱。

11. 根据权利要求9或10所述的试剂盒,其特征在于,步骤S2中,所述动物血清上样前通过盐析进行粗提。

12. 根据权利要求9-11中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述动物对人IgG免疫耐受。

13. 根据权利要求1-6中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体为单克隆抗体。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,对细胞培养上清液进行检测,并保留阳性细胞株。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的制备方法具体包括以

下步骤：

T1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠的脾脏细胞；

T2,将小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行克隆培养,获得细胞培养上清液；

T3,利用表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测,获得阳性反应克隆；

T4,将所述阳性反应克隆分别与表面结合有与步骤T3相同抗原的酶标板和表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测,舍弃有任意一项为阳性反应的所述阳性反应克隆；

T5,剩余的阳性反应克隆的稳定细胞株经培养或制备腹水,获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

16.根据权利要求15所述的试剂盒,其特征在于,所述表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板的制备方法为:将与免疫时不同的抗原结合到酶标板上,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后洗涤,获得表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板。

17.根据权利要求15或16所述的试剂盒,其特征在于,步骤T2中,所述小鼠骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0。

18.根据权利要求13所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的制备方法包括:其将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞的总RNA反转录的cDNA为模板的PCR扩增产物克隆至噬菌体中;然后筛选出阳性噬菌体,并对阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达,获得特异性识别抗人免疫复合物的单克隆抗体。

19.根据权利要求18所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

M1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠脾脏细胞的总RNA;

M2,将所述总RNA反转录至cDNA后,以cDNA为模板,利用小鼠IgG特异性引物进行PCR扩增,获得扩增产物;

M3,将扩增产物克隆至噬菌体中,并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应,获取阳性噬菌体;

M4,将所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达和纯化,获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

20.根据权利要求19所述的试剂盒,其特征在于,将与免疫时不同的抗原固定至固相表面,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后洗涤,形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

21.根据权利要求14-20中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述小鼠对人IgG免疫耐受。

22.一种如权利要求1-21中任意一项所述的试剂盒在均相化学发光检测方法中的应用。

23.一种均相免疫检测试剂盒,其包括以下试剂:

试剂1:其包括如权利要求1-21中任意一项所述试剂盒中包含的能够特异性识别人免疫复合物的第一抗体,其与第一标记物相结合;

试剂2:其包括在激发状态下生成单线态氧的供体,所述供体与第二标记物相结合;所述第二标记物能够与第一标记物特异性结合;

试剂3:其包括与单线态氧反应生成可检测信号的受体,所述受体与已知抗原相结合,所述已知抗原能够与待检抗体特异性结合。

24.根据权利要求23所述的试剂盒,其特征在于,所述第一标记物和第二标记物中的一种为生物素,另一种为链霉亲和素;优选地,所述第一标记物为生物素,第二标记物为链霉亲和素。

25.根据权利要求23或24所述的试剂盒,其特征在于,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,所述受体为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

26.根据权利要求23-25任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述供体是光活化的或化学活化的敏化剂,非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

27.根据权利要求1-26中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体的浓度为0.1~10ug/ml;优选为0.5~5ug/ml;进一步优选为1~3ug/ml。

28.一种如权利要求1-21中任意一项所述的免疫检测试剂盒或如权利要求23-27中任意一项所述的均相免疫检测试剂盒在检测人血清或血浆中待测抗体中的应用。

一种免疫检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种免疫检测试剂盒、均相免疫试剂盒及其在间接均相免疫检测人血清或血浆中的目标抗体中的应用。

背景技术

[0002] 间接法是测定抗体最常用的方法,其原理为利用标记的二抗检测与固相载体结合的受检抗体。将抗原连接到固相载体上,然后加入待测样本,使样本中的受检抗体与固相载体上的抗原结合形成免疫复合物,再用标记二抗与免疫复合物中的抗体结合形成固相抗原-受检抗体-标记二抗复合物,最后通过检测标记二抗来确定待测样本中受检抗体的含量。

[0003] 在传统的检测方法中,以酶联免疫吸附实验(ELISA)为例,以特异性抗原包被酶标板,二抗标记辣根过氧化物酶(HRP),在加入待测样本和酶标二抗后分别进行洗涤。固相抗原和待测样本反应后的洗涤过程,将血清中非特异的抗体冲洗干净,只有特异性抗体与固相载体上的抗原形成免疫复合物而保留下来。这样在加入酶标二抗后就不会有非特异性抗体与特异性抗体竞争结合酶标二抗,从而干扰检测。

[0004] 均相免疫检测法作为新一代的免疫检测方法,与传统免疫检测方法相比具有速度快、通量高等优点,但由于平台反应特点的局限,目前并不适合用于间接法检测。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足提供一种免疫检测试剂盒及其应用。所述试剂盒中包括特异性识别人免疫复合物的第一抗体,该抗体的特异性识别性能较高,其既不结合人免疫复合物中单独的抗原,也不结合人免疫复合物中单独的抗体,利用该含有抗体的试剂盒,实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用。

[0006] 为此,本发明第一方面提供了一种免疫试剂盒,其包括特异性识别人免疫复合物的第一抗体;所述第一抗体能够特异性识别人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体,但不识别游离的人IgG以及游离的目标抗体。

[0007] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体通过识别表位与人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体相结合;所述识别表位为构象表位和/或线性表位。

[0008] 在本发明的一些具体实施方式中,所述识别表位位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的恒定区。

[0009] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述识别表位不位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的轻链部分。

[0010] 在本发明的一些具体实施方式中,所述识别表位位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的Fc段。

[0011] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述识别表位的氨基酸序列包含5~10个氨基酸。

[0012] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体为多克隆抗体。

[0013] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法包括:用人免疫复合物对动物进行免疫,获取含有第一抗体的动物血清;然后所述动物血清经亲和层析纯化得到特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0014] 在本发明的进一步优选的具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0015] S1,用第一组人免疫复合物对动物进行免疫,免疫结束后,收集动物血清;

[0016] S2,将所述动物血清上样至结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱上,经洗涤、洗脱后,获得含特异性识别人免疫复合物的第一抗体的洗脱液;

[0017] S3,将所述洗脱液经透析后上样至抗人IgG亲和层析柱上,穿透液中获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0018] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱的制备方法为:将与免疫时不同的抗原固定在亲和层析柱上,然后将与所述抗原特异反应的阳性人血清上样至所述亲和层析柱上,使阳性人血清中的特异性抗体与所述抗原形成第二组人免疫复合物,获得结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱。

[0019] 在本发明的另一些优选的具体实施方式中,步骤S2中,所述动物血清上样前通过盐析进行粗提。

[0020] 根据本发明,所述动物对人IgG免疫耐受;所述动物可以选自豚鼠,兔子,山羊等。

[0021] 本发明对步骤S2中洗脱时采用的洗脱液没有特殊限定,所述洗脱液可为pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液。

[0022] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一抗体为单克隆抗体;所述单克隆抗体的制备方法可以为细胞融合法或噬菌体展示法。

[0023] 在本发明的一些具体的实施方式中,所述第一抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,对细胞培养上清液进行检测,并保留阳性细胞株。

[0024] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0025] T1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠的脾脏细胞;

[0026] T2,将小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行克隆培养,获得细胞培养上清液;

[0027] T3,利用表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测,获得阳性反应克隆;

[0028] T4,将所述阳性反应克隆分别与表面结合有与步骤T3相同抗原的酶标板和表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测,舍弃有任意一项为阳性反应的所述阳性反应克隆;

[0029] T5,剩余的阳性反应克隆的稳定细胞株经培养或制备腹水,获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0030] 在本发明进一步优选的具体实施方式中,所述表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板的制备方法为:将与免疫时不同的抗原结合到酶标板上,然后加入与所述抗原特异

反应的阳性人血清,反应后洗涤,获得表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板。

[0031] 在本发明进一步优选的具体实施方式中,步骤T2中,所述小鼠骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0。

[0032] 本发明中,所述小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞可在PEG介导下进行融合。

[0033] 本发明中,利用表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测的具体操作为:

[0034] (1) 在表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板中加入所述细胞培养上清,反应后充分洗涤;(2) 加入HRP标记的抗鼠二抗,反应后充分洗涤;(3) 加入TMB底物反应15min后显色,加入2M硫酸终止反应并在OD_{450nm}下读数。

[0035] 本发明中,所述阳性反应克隆与表面结合有与步骤T3相同抗原的酶标板进行间接法ELISA检测以及与表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测的操作如上。

[0036] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法包括:其将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞的总RNA反转录的cDNA为模板的PCR扩增产物克隆至噬菌体中;然后筛选出阳性噬菌体,并对阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达,获得特异性识别抗人免疫复合物的单克隆抗体。

[0037] 在本发明的进一步优选的具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0038] M1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠脾脏细胞的总RNA;

[0039] M2,将所述总RNA反转录至cDNA后,以cDNA为模板,利用小鼠IgG特异性引物进行PCR扩增,获得扩增产物;

[0040] M3,将扩增产物克隆至噬菌体中,并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应,获取阳性噬菌体;

[0041] M4,将所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达和纯化,获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0042] 根据本发明,将与免疫时不同的抗原固定至固相表面,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后洗涤,形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

[0043] 根据本发明,所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达的方式为:将阳性噬菌体上的抗体基因克隆至合适的表达载体,然后将表达载体转化到合适的表达细胞中,进而对抗体基因进行重组表达。

[0044] 本发明中,所述小鼠对人IgG免疫耐受。本发明所述小鼠的类型无特殊限定,所述小鼠可为8周左右的Ba1b/c雄性小鼠。

[0045] 本发明第二方面提供了一种如本发明第一方面所述的试剂盒在均相化学发光检测方法中的应用。

[0046] 本发明第三方面提供了一种均相免疫检测试剂盒,其包括以下试剂:

[0047] 试剂1:其包括如权利要求1-21中任意一项所述试剂盒中包含的能够特异性识别人免疫复合物的第一抗体,其与第一标记物相结合;

[0048] 试剂2:其包括在激发状态下生成单线态氧的供体,所述供体与第二标记物相结合;所述第二标记物能够与第一标记物特异性结合;

[0049] 试剂3:其包括与单线态氧反应生成可检测信号的受体,所述受体与已知抗原相结合,所述已知抗原能够与待检抗体特异性结合。

[0050] 在本发明的一些具体实施例中,所述第一标记物和第二标记物中的任一种可为生物素,另一种可为链霉亲和素。优选地,所述第一标记物可为生物素,第二标记物可为链霉亲和素。

[0051] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,所述受体为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0052] 在本发明的一些具体实施方式中,所述供体是光活化的或化学活化的敏化剂,非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

[0053] 在本发明的一些实施方式中,所述特异性识别人免疫复合物的第一抗体的浓度为0.1~10ug/ml;优选为0.5~5ug/ml;进一步优选为1~3ug/ml。

[0054] 本发明第四方面涉及一种如本发明第一发明所述的免疫检测试剂盒或如本发明第三方面所述的均相免疫检测试剂盒在检测人血清或血浆中待测抗体中的应用。值得注意的是,该检测方法可为间接均相免疫检测方法。

[0055] 具体地,检测人血清或血浆(待测样本)中待测抗体的间接均相免疫测定方法,其包括如下步骤:

[0056] (1)同时或依次或先后准备如下试剂:

[0057] (i)待测样本;所述待测样本中可能含有待测抗体;

[0058] (ii)第一组合物,其包含与第一标记物相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体;

[0059] (iii)第二组合物,其包含与已知抗原相结合的受体,所述受体能与单线态氧反应生成检测信号,所述已知抗原能与目标抗体特异性结合;

[0060] (iv)第三组合物,其包含与第二标记物相结合的供体;所述供体能在激发状态下生成单线态氧;所述第二标记物能够与第一标记物特异性结合;

[0061] (2)允许将试剂(i)、(ii)和(iii)相混合,如果待测样本中存在待测抗体,那么待测抗体将与已知抗原结合而形成由受体-已知抗原-待测抗体构成的第一免疫复合物;与第一标记物相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体识别所述第一免疫复合物中的待测抗体,从而与第一免疫复合物结合形成由受体-已知抗原-待测抗体-第一抗体构成的第二免疫复合物;

[0062] (3)允许将试剂(iv)和所述第二免疫复合物相混合,通过第二标记物与第一标记物的特异性结合,使供体与第二免疫复合物中特异性识别人免疫复合物中的第一抗体间接结合,进而使供体能够靠近受体,形成由受体-已知抗原-待测抗体-第一抗体-供体构成的第三免疫复合物;

[0063] (4)利用能量或活性化合物激发所述供体生成单线态氧,第三免疫复合物中的受体与接触的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;

[0064] (5)任选地重复步骤(2)-(4);

[0065] (6)分析化学发光信号值,从而判断待测样本中是否存在待测抗体和/或待测抗体

的浓度。

[0066] 本发明的有益效果为：本发明提供了一种免疫检测试剂盒及其应用。所述试剂盒中包括特异性识别免疫复合物的第一抗体，该抗体既不结合人免疫复合物中单独的抗原，也不结合人免疫复合物中单独的抗体，利用该含有抗体的试剂盒，实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用。

具体实施方式

[0067] 为使本发明容易理解，下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前，应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解，本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式，而并不表示限制性的。

[0068] 在提供了数值范围的情况下，应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中，并且也涵盖在本发明内，服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下，排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0069] 除非另有定义，本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用，但是现在描述了优选的方法和材料。

[0070] I. 术语

[0071] 本发明所述用语“均相”所对应的英文术语为“homogeneous”，其是指无须对结合的抗原抗体复合物和剩余的游离抗原或抗体进行分离，既可进行检测。

[0072] 本发明所述用语“免疫耐受”是指对抗原特异性应答的T细胞与B细胞，在抗原刺激下，不能被激活，不能产生特异性免疫效应细胞及特异性抗体，从而不能执行正免疫应答的现象。它不同于免疫缺陷或使用免疫抑制剂后造成的抑制状态，不会导致自身免疫病的发生。

[0073] 本发明所述用语“抗体”是一种由浆细胞(效应B细胞)分泌，被免疫系统用来鉴别与中和外来物质如细菌、病毒等的大型Y形蛋白质，其涵盖具有所需特异性的结合结构域的任意特异性结合因子。

[0074] 本发明所述用语“抗原”是指能够刺激机体产生免疫应答，并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结合，发生免疫效应的物质。

[0075] 本发明所述用语“结合”指由于例如共价、静电、疏水、离子和/或氢键等相互作用，包括但不限于如盐桥和水桥等相互作用引起的两个分子间的直接联合。

[0076] 本发明所述用语“特异性结合”，是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应，从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0077] 本发明所述用语“第一标记物”和“第二标记物”是指这样一对分子，它们能够相互特异性结合，例如，酶-底物、抗原-抗体、配基-受体。一个具体的特异性结合配对成员对的例子是生物素-链霉亲和素系统，其中“生物素”广泛存在于动植物组织中，其分子上有两个环状结构，分别为咪唑酮环和噻吩环，其中咪唑酮环是与链霉亲和素结合的主要部位。活化的生物素可以在蛋白质交联剂的介导下，与已知的几乎所有生物大分子偶联，包括蛋白质、

核酸、多糖和脂类等；而“链霉亲和素”是由链霉菌分泌的一种蛋白质，分子量为65kD。“链霉亲和素”分子由4条相同的肽链组成，其中每条肽链都能结合一个生物素。因此每个抗原或抗体可同时偶联多个生物素分子，从而产生“触手效应”提高分析灵敏度。

[0078] 在任何需要的情况下，本发明中所用的任何试剂，包括抗原、抗体、受体或供体，可以根据实际需要缀合第一标记物和第二标记物中的任一员。

[0079] 本发明所述用语“供体”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体可以是光活化的（如染料和芳香化合物）或者化学活化的（如酶、金属盐等）。

[0080] 在本发明一些具体实施例中，所述供体是光敏剂，所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂，优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物，其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994（该专利文献在此全文引为参考）公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物，以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物，所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对成员的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用，例如美国专利US6406913中记载的内容，该专利文献并入本文以供参考。

[0081] 在本发明另一些具体实施例中，所述供体是化学活化的其他敏化剂，其非限定性的例子是某些化合物，它们催化过氧化氢转化为单线态氧和水。其他一些供体的例子包括：1,4-二羧基乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物等，加热这些化合物或者这些化合物直接吸收光会释放单线态氧。

[0082] 本发明所述用语“受体”是指能够与单线态氧反应可以产生可检测信号的化合物。供体被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的单线态氧，该高能态的单线态氧被近距离的受体俘获，从而传递能量以激活所述受体。

[0083] 在本发明的一些具体实施例中，所述受体是这样的物质：其经历与单线态氧的化学反应以形成不稳定的亚稳态中间体，所述亚稳态中间体可以分解，同时或随后发光。这些物质的典型例子包括但不限于：烯醇醚、烯胺、9-烷叉黄原胶、9-烷叉-N-烷基吡啶满、芳乙炔醚、双环氧乙烷、二甲基噻吩、芳香性咪唑或光泽精。

[0084] 在本发明的另一些具体实施例中，所述受体是能够与单线态氧反应以形成可以分解成酮类或羧酸衍生物的氢过氧化物或二氧环丁烷的烯烃类；可以通过光的作用分解的稳定二氧环丁烷；可以与单线态氧反应以形成二酮类的乙炔类；可以形成偶氮化合物或偶氮羰基化合物的腈类或酰肼类，诸如鲁米诺；和可以形成内过氧化物类的芳族化合物。可以根据本公开和要求保护的发明利用的受体的具体的、非限制性实例记载于美国专利号US5340716（该专利文献在此全文引为参考）。

[0085] 在本发明另一些具体实施例中，所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物，其是非粒子化的且可溶于含水介质中，这种受体的制备方法可参见专利PCT/US2010/025433（该专利文献在此全文引为参考）。

[0086] 在本发明另一些具体实施例中，所述“供体”和/或“受体”可以通过功能基团被包被在基体上形成“供体微球”和/或“受体微球”。本发明所述“基体”是本领域技术人员所公知的微球或微粒，其可以是任何尺寸的，其可以是有机或是无机的，其可以是可膨胀或不可膨胀的，其可以是多孔的或非多孔的，其具有任何密度，但优选具有和水接近的密度，优

选能漂浮于水中,且由透明、部分透明或不透明的材料构成。所述基体可以有或没有电荷,当带有电荷时,优选是负电荷。所述基体可以是固体(如聚合物、金属、玻璃、有机和无机物诸如矿物、盐和硅藻)、小油滴(如碳氢化合物、碳氟化合物、硅质流体)、囊泡(如合成的诸如磷脂、或天然的诸如细胞、及细胞器官)。基体可以是乳胶颗粒或是含有有机或无机聚合物的其他颗粒、脂双层如脂质体、磷脂囊泡、小油滴、硅颗粒、金属溶胶、细胞和微晶染料。基体通常具有多功能性,或者能够通过特异或非特异的共价或非共价相互作用而结合到供体或受体上。有许多官能团是可用的或者将其合并进来。典型的官能团包括羧酸、乙醛、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基等。适用于本发明的基体的一个非限制性的例子是羧基改性的乳胶颗粒。这种基体的详细情况可参见美国专利US5709994与US5780646(这两篇专利文献在此全文引为参考)。

[0087] 本发明所述用语“表位”是指能够特异性结合免疫球蛋白或者T细胞受体的任何蛋白决定簇。

[0088] II. 实施例

[0089] 如前所述,由于均相反应的检测平台中没有传统方法的冲洗过程,导致待检样本中所存在的非特异性免疫球蛋白大量消耗标记二抗,进而对检测结果产生严重干扰,限制了间接法在均相免疫检测抗体中的应用。本申请的发明人通过研究获得的一种免疫检测试剂盒,其内包含能够特异性识别人免疫复合物的第一抗体,该抗体既不结合人免疫复合物中单独的抗原,也不结合人免疫复合物中单独的抗体。因此后续加入的与标记物结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体由于不与待测样本中的非特异免疫球蛋白结合,使得检测过程中即使不存在非特异的免疫球蛋白的冲洗过程,也不会对检测结果带来干扰,实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用。本发明正是基于上述方法作出的。

[0090] 因此,本发明第一方面所涉及的免疫试剂盒,其包括特异性识别人免疫复合物的第一抗体;所述第一抗体能够特异性识别人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体,但不识别游离的人IgG以及游离的目标抗体。

[0091] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体通过识别表位与人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体相结合;所述识别表位为构象表位和/或线性表位。

[0092] 在本发明的一些具体实施方式中,所述识别表位位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的恒定区。

[0093] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述识别表位不位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的轻链部分。

[0094] 在本发明的一些具体实施方式中,所述识别表位位于所述人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体的Fc段。

[0095] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述识别表位的氨基酸序列包含5~10个氨基酸。

[0096] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体为多克隆抗体。

[0097] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法包括:用人免疫复合物对动物进行免疫,获取含有第一抗体的动物血清;然后所述动物血清经亲和层析纯化得到特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0098] 在本发明的进一步优选的具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法具体包括以

下步骤:

[0099] S1,用第一组人免疫复合物对动物进行免疫,免疫结束后,收集动物血清;

[0100] S2,将所述动物血清上样至结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱上,经洗涤、洗脱后,获得含特异性识别人免疫复合物的第一抗体的洗脱液;

[0101] S3,将所述洗脱液经透析后上样至抗人IgG亲和层析柱上,穿透液中获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0102] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱的制备方法为:将与免疫时不同的抗原固定在亲和层析柱上,然后将与所述抗原特异反应的阳性人血清上样至所述亲和层析柱上,使阳性人血清中的特异性抗体与所述抗原形成第二组人免疫复合物,获得结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱。

[0103] 在本发明的另一些优选的具体实施方式中,步骤S2中,所述动物血清上样前通过盐析进行粗提。

[0104] 根据本发明,所述动物对人IgG免疫耐受;所述动物可以选自豚鼠,兔子,山羊等。

[0105] 本发明对步骤S2中洗脱时采用的洗脱液没有特殊限定,所述洗脱液可为pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液。

[0106] 在本发明的一些具体实施例中,所述第一抗体的制备方法具体包括:

[0107] (1)在正式免疫前一周待免疫动物(例如豚鼠、兔子和山羊等)通过静脉注射较高剂量的人IgG以诱导动物产生对人IgG的免疫耐受。一周后用第一组人免疫复合物(如待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物)以合适剂量对该动物进行免疫,后续进行若干次加强免疫。加强免疫结束后,收集所述动物的血清。

[0108] (2)将与免疫时不同的抗原通过合适途径固定在亲和层析柱上,然后将与所述层析柱上的抗原特异反应的阳性人血清过所述层析柱,使固定在层析柱上的抗原与阳性人血清中的特异性抗体形成免疫复合物(与免疫时所用免疫复合物不同,如免疫时使用待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物,而亲和层析柱上为乙肝核心抗原与人抗乙肝核心抗原的免疫复合物),获得纯化步骤(1)获得的动物血清的结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱。

[0109] (3)将步骤(1)获得的动物血清通过盐析粗提后,上样至步骤(2)制备的亲和层析柱上并充分洗涤,然后用pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液进行洗脱,获得含特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体的洗脱液;采用上述缓冲液进行洗脱时,能洗脱掉亲和层析柱上所有的抗体(特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体和与亲和层析柱上所固定的抗原相结合的抗体),因此上述洗脱液中还含有与亲和层析柱上所固定的抗原相结合的抗体。

[0110] (4)将步骤(3)获得的洗脱液经透析后上样至抗人IgG亲和层析柱上以吸附掉与亲和层析柱上所固定的抗原相结合的抗体,经再次洗脱和透析后检测该多克隆抗体的浓度活性,获得特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0111] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一抗体为单克隆抗体;所述单克隆抗体的制备方法可以为细胞融合法或噬菌体展示法。

[0112] 在本发明的一些具体的实施方式中,所述第一抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,对细胞培养上清液进行检测,并保留阳性细胞株。

[0113] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0114] T1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠的脾脏细胞;

[0115] T2,将小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行克隆培养,获得细胞培养上清液;

[0116] T3,利用表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测,获得阳性反应克隆;

[0117] T4,将所述阳性反应克隆分别与表面结合有与步骤T3相同抗原的酶标板和表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测,舍弃有任意一项为阳性反应的所述阳性反应克隆;

[0118] T5,剩余的阳性反应克隆的稳定细胞株经培养或制备腹水,获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0119] 在本发明进一步优选的具体实施方式中,所述表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板的制备方法为:将与免疫时不同的抗原结合到酶标板上,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后洗涤,获得表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板。

[0120] 在本发明进一步优选的具体实施方式中,步骤T2中,所述小鼠骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0。

[0121] 本发明中,所述小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞可在PEG介导下进行融合。

[0122] 本发明中,利用表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测的具体操作为:

[0123] (1)在表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板中加入所述细胞培养上清,反应后充分洗涤;(2)加入HRP标记的抗鼠二抗,反应后充分洗涤;(3)加入TMB底物反应15min后显色,加入2M硫酸终止反应并在OD450nm下读数。

[0124] 本发明中,所述阳性反应克隆与表面结合有与步骤T3相同抗原的酶标板进行间接法ELISA检测以及与表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测的操作如上。

[0125] 在本发明的一些具体实施例中,所述第一抗体的制备方法具体包括:

[0126] (1)选取3-5只8周左右的Balb/c雄性小鼠,在正式免疫前通过尾静脉注射2mg人IgG以诱导小鼠产生对人IgG的免疫耐受。一周后用第一组人免疫复合物(如待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物)以合适剂量对小鼠进行免疫,后续进行若干次加强免疫。最后一次加强免疫结束后第三天,无菌环境下处死小鼠取小鼠脾脏,并用适当的方法均匀分散脾脏细胞,获得小鼠的脾脏细胞。

[0127] (2)在PEG介导下,将小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤进行融合,并用有限稀释法滴加至96孔细胞培养板进行培养,培养10天左右后,获得细胞培养上清液。

[0128] (3)将与免疫时不同的抗原(如乙肝表面抗原)包被至酶标板上,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后充分洗涤,获得表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板。利用该酶标板可以对上述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测。

[0129] (4)在表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板中加入细胞培养板各孔中的细胞培养上清液,反应后充分洗涤;加入HRP标记的抗鼠二抗,反应后充分洗涤;加入TMB底物反应15min后显色,加入2M硫酸终止反应并在OD450nm下读数,获得阳性反应克隆。

[0130] (5) 将所述阳性反应克隆再分别与表面结合有与步骤(3)相同抗原的酶标板和表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测,舍弃有任意一项为阳性反应的所述阳性反应克隆。

[0131] (6) 将剩余的阳性反应克隆再进行几轮必要的克隆化(即重复上述步骤(4)和(5)),使细胞株稳定。然后用体外培养或制备腹水等方式,进行单抗制备。纯化培养上清或腹水,获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0132] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法包括:其将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞的总RNA反转录的cDNA为模板的PCR扩增产物克隆至噬菌体中;然后筛选出阳性噬菌体,并对阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达,获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0133] 在本发明的进一步优选的具体实施方式中,所述第一抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0134] M1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠脾脏细胞的总RNA;

[0135] M2,将所述总RNA反转录至cDNA后,以cDNA为模板,利用小鼠IgG特异性引物进行PCR扩增,获得扩增产物;

[0136] M3,将扩增产物克隆至噬菌体中,并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应,获取阳性噬菌体;

[0137] M4,将所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达和纯化,获得特异性识别人免疫复合物的第一抗体。

[0138] 根据本发明,将与免疫时不同的抗原固定至固相表面,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后洗涤,形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

[0139] 根据本发明,所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达的方式为:将阳性噬菌体上的抗体基因克隆至合适的表达载体,然后将表达载体转化到合适的表达细胞中,进而对抗体基因进行重组表达。

[0140] 在本发明的一些具体实施例中,所述第一抗体的制备方法具体包括:

[0141] (1) 选取3-5只8周左右的Balb/c雄性小鼠,在正式免疫前通过尾静脉注射2mg人IgG以诱导小鼠产生对人IgG的免疫耐受。一周后用第一组人免疫复合物(如待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物)以合适剂量对小鼠进行免疫,后续进行若干次加强免疫。最后一次加强免疫结束后第三天,无菌环境下处死小鼠取小鼠脾脏,并提取小鼠脾脏总RNA,获取小鼠脾脏细胞的总RNA。

[0142] (2) 将所述总RNA反转录至cDNA后,以cDNA为模板,利用适当的小鼠IgG特异性引物对所述总RNA进行PCR扩增,获得扩增产物。

[0143] (3) 将与免疫时不同的抗原(如乙肝表面抗原)固定至固相表面,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后充分洗涤,形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

[0144] (4) 将步骤(2)中的扩增产物克隆至噬菌体中,并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应,清洗与固相不结合的噬菌体,洗脱与固相结合噬菌体,获取阳性噬菌体并进行增殖。

[0145] (5) 重复步骤(4) 3-4次,且每次加强洗脱强度,最终得到与固相上第二组人的免疫复合物高度结合的阳性噬菌体。

[0146] (6) 将步骤(5)获得的阳性噬菌体上的抗体基因克隆至合适的表达载体,然后将表达载体转化到合适的表达细胞中,进而对抗体基因进行重组表达,纯化后获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0147] 本发明中,所述小鼠对人IgG免疫耐受。本发明所述小鼠的类型无特殊限定,所述小鼠可为8周左右的Balb/c雄性小鼠。

[0148] 本发明第二方面涉及一种如本发明第一方面所述的试剂盒在均相化学发光检测方法中的应用。

[0149] 本发明第三方面涉及一种均相免疫检测试剂盒,其具体包括以下试剂:

[0150] 试剂1:其包括如本发明第一方面所述试剂盒中包含的能够特异性识别人免疫复合物的第一抗体,其与第一标记物相结合;

[0151] 试剂2:其包括在激发状态下生成单线态氧的供体,所述供体与第二标记物相结合;所述第二标记物能够与第一标记物特异性结合;

[0152] 试剂3:其包括与单线态氧反应生成可检测信号的受体,所述受体与已知抗原相结合,所述已知抗原能够与待检抗体特异性结合;

[0153] 试剂4:目标抗体的校准品。

[0154] 本发明对第一标记物和第二标记物没有特殊限定。在一些具体实施例中,所述第一标记物可为生物素,所述第二标记物可为链霉亲和素。

[0155] 在本发明的一些具体实施例中,所述第一标记物和第二标记物中的任一种可为生物素,另一种可为链霉亲和素。优选地,所述第一标记物可为生物素,第二标记物可为链霉亲和素。

[0156] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,所述受体为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0157] 在本发明的一些具体实施方式中,所述供体是光活化的或化学活化的敏化剂,非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

[0158] 在本发明的一些实施方式中,所述特异性识别人免疫复合物的第一抗体的浓度为0.1~10ug/ml;优选为0.5~5ug/ml;进一步优选为1~3ug/ml。

[0159] 本发明中,所述均相免疫检测试剂盒的制备方法没有明确限定,在一些具体的操作中,所述均相免疫检测试剂盒的制备方法为:

[0160] 1) 配制目标抗体的校准品;2) 将与目标抗体特异性结合的已知抗原与受体相结合,获得与已知抗原相结合的受体;3) 用生物素标记特异性识别人免疫复合物的第一抗体,获得与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体;4) 用链霉亲和素包被供体,获得与链霉亲和素结合的供体;5) 配制与已知抗原相结合的受体的稀释液;6) 配制与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体的稀释液;7) 配制与链霉亲和素结合的供体的稀释液;8) 用相应的稀释液分别稀释与已知抗原相结合的受体、与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体以及与链霉亲和素结合的供体;9) 分装上述稀释后的与

已知抗原相结合的受体、与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体以及与链霉亲和素结合的供体,最后将各组分组装为试剂盒。

[0161] 本发明第四方面涉及一种如本发明第一发明所述的免疫检测试剂盒或如本发明第三方面所述的均相免疫检测试剂盒在检测人血清或血浆中待测抗体中的应用。值得注意的是,该检测方法可为间接均相免疫检测方法。

[0162] 具体地,检测人血清或血浆(待测样本)中待测抗体的间接均相免疫测定方法,其包括如下步骤:

[0163] (1) 同时或依次或先后准备如下试剂:

[0164] (i) 待测样本;所述待测样本中可能含有待测抗体;

[0165] (ii) 第一组合物,其包含与第一标记物相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体;

[0166] (iii) 第二组合物,其包含与已知抗原相结合的受体,所述受体能与单线态氧反应生成检测信号,所述已知抗原能与目标抗体特异性结合;

[0167] (iv) 第三组合物,其包含与第二标记物相结合的供体;所述供体能在激发状态下生成单线态氧;所述第二标记物能够与第一标记物特异性结合;

[0168] (2) 允许将试剂(i)、(ii)和(iii)相混合,如果待测样本中存在待测抗体,那么待测抗体将与已知抗原结合而形成由受体-已知抗原-待测抗体构成的第一免疫复合物;与第一标记物相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体识别所述第一免疫复合物中的待测抗体,从而与第一免疫复合物结合形成由受体-已知抗原-待测抗体-第一抗体构成的第二免疫复合物;

[0169] (3) 允许将试剂(iv)和所述第二免疫复合物相混合,通过第二标记物与第一标记物的特异性结合,使供体与第二免疫复合物中特异性识别人免疫复合物中的第一抗体间接结合,进而使供体能够靠近受体,形成由受体-已知抗原-待测抗体-第一抗体-供体构成的第三免疫复合物;

[0170] (4) 利用能量或活性化合物激发所述供体生成单线态氧,第三免疫复合物中的受体与接触的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;

[0171] (5) 任选地重复步骤(2)-(4);

[0172] (6) 分析化学发光信号值,从而判断待测样本中是否存在待测抗体和/或待测抗体的浓度。

[0173] 进一步具体地,在光激化学发光平台进行间接法均相免疫检测待测人血清或血浆中待测抗体的方法为:在反应板的反应孔中加入与第一标记物相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体溶液、与已知抗原相结合的受体溶液和待检人血清或血浆;然后将反应板放入光激化学发光检测仪中,设置第一步的温育时间为15min,自动加入与第二标记物相结合的供体溶液,第二步的温育时间为10min;最后进行光激发并进行读数,记录化学发光信号值。并将该化学发光值与待测抗体的校准品在相同条件下获得的化学发光信号值进行比较;若待检人血清或血浆的化学发光信号值不低于待测抗体校准品的化学发光值,则待检人血清或血浆中含有待测抗体。

[0174] 在此,需要特别说明的是,上述方法为非疾病诊断目的的方法。

[0175] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实

施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0176] 实施例1:制备特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体

[0177] (1) 诱导新西兰大白兔对人IgG免疫耐受

[0178] 购买注射用人免疫球蛋白2.5克,浓度50mg/ml,取20ml在生理盐水进行透析,期间更换透析液3次。将完成透析的人免疫球蛋白在100000g离心力下离心90min,取上层1/3的液体,获得单体人IgG,并测定其浓度。

[0179] 取8只体重在2.5kg左右的雄性新西兰大白兔,每只兔子耳缘静脉注射单体人IgG 10mg,诱导新西兰大白兔对人IgG免疫耐受。

[0180] (2) 制备免疫复合物并用该免疫复合物对兔子进行免疫

[0181] 用5ml注射器预先抽取2ml阿氏液,从每只兔子的耳缘静脉各抽取全血2ml左右,并与阿氏液迅速混匀,获得含阿氏液的兔全血。

[0182] 将含阿氏液的兔全血转移至15ml离心管中,1000rpm离心5min,弃上清液。用生理盐水重悬浮底层红细胞,1000rpm离心5min,弃上清,重复操作3次充分清洗红细胞并计数。

[0183] 保留 5×10^9 个红细胞,加入10ml正常人血清(正常人血清中含有针对动物红细胞的抗体),轻轻吹吸,使红细胞与人血清充分混匀,室温反应30min,期间不时混匀,以形成红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清;用生理盐水重悬浮红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清,重复本步骤3次,最终用5ml生理盐水重悬浮红细胞免疫复合物。按照 1×10^9 、 2×10^9 和 2×10^9 个红细胞的剂量,在第1、3、5天分3次免疫做过人IgG免疫耐受的兔子,免疫部位为背部皮下。

[0184] (3) 评估血清中抗体效价

[0185] 首次免疫后第10和第20天分别抽血,第30天放血处死兔子并收集血清,并用间接法ELISA检测兔血清中抗体效价。

[0186] 具体方法为:利用乙肝核心抗原包被酶标板并用BSA封闭,加入乙肝核心抗体阳性临床血清,并于37℃孵育60min,然后直接加入待评估的稀释后的兔血清37℃再次孵育60min,洗板,加入HRP标记的羊抗兔IgG工作液37℃孵育60min,洗板,加入TMB底物37℃孵育15min,加入2M H_2SO_4 终止反应并读数,具体数据如表1-3所示。

[0187] 表1:首次免疫后第10天兔血清中抗体效价

[0188]

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
10000	0.1106	0.1694	0.1403	0.1220	0.1446	0.1216	0.1267	0.1145
1000	0.1394	0.5199	0.3102	0.4200	0.3227	0.1721	0.1084	0.2842
100	0.9874	1.8699	1.3351	1.6106	1.3367	0.7115	0.5412	1.1412
10	1.5354	2.5083	2.4371	2.5663	2.5656	1.6474	1.5641	1.6241

[0189] 表2:首次免疫后第20天兔血清中抗体效价

[0190]

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
10000	0.1124	0.1854	0.1547	0.1624	0.1154	0.1136	0.1101	0.1254
1000	0.3145	0.9654	0.6584	0.8541	0.4651	0.3895	0.1954	0.5412

100	1.3254	1.6741	1.4214	1.5821	1.2451	1.1874	0.8941	1.3512
10	2.5284	2.6541	2.6142	2.6421	2.5641	2.4254	1.5421	2.5142

[0191] 表3:首次免疫后第30天兔血清中抗体效价

[0192]

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
10000	0.1074	0.5108	0.3250	0.3951	0.2055	0.1487	0.1243	0.2141

[0193]

1000	0.6254	1.7009	1.3473	1.5012	1.0031	0.6207	0.3089	1.1254
100	1.9421	2.6115	2.5272	2.5142	2.3392	1.8743	1.1943	2.3241
10	2.6521	2.6685	2.6057	2.5254	2.6493	2.6583	2.0444	2.5214

[0194] (4) 亲和纯化血清中的抗体

[0195] 选取效价高的兔血清2#进行抗体纯化。具体方式如下:

[0196] 取重组乙肝核心抗原100mg,按照GE公司CNBr activated sepharose 4B说明书,将上述乙肝核心抗原偶联至sepharose 4B制成乙肝核心抗原免疫亲和层析柱。取人免疫球蛋白100mg,按同样方法制备人IgG免疫亲和层析柱。

[0197] 取200ml乙肝核心抗体阳性临床血清,20000rpm离心60min,上清用0.22um过滤器过滤,并上样至乙肝核心抗原免疫亲和层析柱上,用pH值为7.4的0.01M PBS缓冲液冲洗亲和层析柱至无蛋白洗出,获得结合有乙肝核心抗原的抗原抗体免疫复合物的亲和层析柱。

[0198] 取2#兔血清20ml,20000rpm离心60min,上清用0.22um过滤器过滤,并上样至结合有乙肝核心抗原的抗原抗体免疫复合物的亲和层析柱上。用pH值为7.4的0.01M PBS缓冲液冲洗亲和层析柱至无蛋白洗出后,用pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液进行洗脱,收集洗脱峰,并用pH值为8.5的3M tris.HCl溶液将pH及时调节至中性,获得含特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体的洗脱液。

[0199] 将上述洗脱液通过人IgG免疫亲和层析柱,吸附掉参杂的人乙肝核心抗体,穿透部分即为特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0200] 实施例2:制备特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体

[0201] (1) 诱导小鼠对人IgG免疫耐受

[0202] 购买注射用人免疫球蛋白2.5克,浓度50mg/ml,取20ml在生理盐水进行透析,期间更换透析液3次。将完成透析的人免疫球蛋白在100000g离心力下离心90min,取上层1/3的液体,获得单体人IgG,并测定其浓度。

[0203] 取6只6-8周龄的Ba1b/c雄性小鼠,每只小鼠经尾静脉注射2mg单体人IgG,诱导小鼠对人IgG免疫耐受,一周后进行正式免疫。

[0204] (2) 制备免疫复合物并用该免疫复合物对小鼠进行免疫

[0205] 取3只小鼠,摘除眼球,收集全血至放有10ml阿氏液的15ml离心管,并迅速混匀,获得含阿氏液的小鼠全血。

[0206] 将含阿氏液的小鼠全血1000rpm离心5min,弃上清液。用生理盐水重悬浮底层红细胞,1000rpm离心5min,弃上清,重复本步骤3次,充分清洗红细胞并计数。

[0207] 保留 5×10^9 个红细胞,加入10ml正常人血清(正常人血清中含有针对动物红细胞的抗体),轻轻吹吸,使红细胞与人血清充分混匀,室温反应30min,期间不时混匀,以形成鼠红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清;用生理盐水重悬浮鼠红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清,重复本步骤3次,最终用1.5ml生理盐水重悬浮鼠红细胞免疫复合物。加入1.5ml弗氏完全佐剂并完全乳化,经皮下免疫6只做过人IgG耐受的Balb/c小鼠。

[0208] 2周后用同样的方法制备鼠红细胞免疫复合物,并将鼠红细胞浓度调节至 1×10^9 个细胞/ml,经尾静脉注射免疫以上6周Balb/c小鼠,每只小鼠注射100u1即 1×10^8 个细胞。

[0209] (3) 细胞融合及阳性克隆筛选

[0210] 1) 细胞融合

[0211] 末次尾静脉注射免疫后第三天,处死小鼠,取小鼠脾脏进行细胞融合,细胞融合按经典PEG融合法操作,融合后采用96孔细胞培养板进行培养,获得细胞培养上清液。

[0212] 2) 阳性克隆筛选

[0213] (a) 先进行一轮负筛选,剔除与人IgG有阳性反应的克隆,具体方法如下:

[0214] 将人IgG用ELISA包被缓冲液稀释至5ug/ml,包被酶标板,2-8°C过夜;洗板后,加入2%BSA溶液200u1,37°C孵育1h进行封闭;加入细胞培养上清100u1,37°C孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入HRP标记的羊抗鼠IgG工作液100u1,37°C孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入TMB底物100u1,37°C孵育15min显色,加入2M硫酸终止反应并进行OD_{450nm}读数,剔除负筛选阳性反应克隆。

[0215] (b) 在剔除负筛选阳性克隆后进行正筛选,具体方法如下:

[0216] 将重组乙肝核心抗原用ELISA包被缓冲液稀释至5ug/ml,包被酶标板,2-8°C过夜;洗板后,加入2%BSA溶液200u1,37°C孵育1h进行封闭;加入乙肝核心抗体阳性临床血清100u1,37°C孵育1h,再加入细胞培养上清,继续孵育1h;加入HRP标记的羊抗鼠IgG工作液100u1,37°C孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入TMB底物100u1,37°C孵育15min显色,加入2M硫酸终止反应并进行OD_{450nm}读数,保留正筛选阳性反应克隆。

[0217] (c) 完成以上正筛选后,再做最后一轮负筛选,具体方法如下:

[0218] 将重组乙肝核心抗原用ELISA包被缓冲液稀释至5ug/ml,包被酶标板,2-8°C过夜;洗板后,加入2%BSA溶液200u1,37°C孵育1h进行封闭;加入细胞培养上清,孵育1h;加入HRP标记的羊抗鼠IgG工作液100u1,37°C孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入TMB底物100u1,37°C孵育15min显色,加入2M硫酸终止反应并进行OD_{450nm}读数,剔除负筛选阳性反应克隆。

[0219] 经过以上筛选得到的阳性克隆再经过3轮克隆化操作(重复上述(a)-(b)3次)得到稳定细胞株。

[0220] 然后用体外培养或制备腹水等方式,进行单抗制备。纯化培养上清或腹水,获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0221] 实施例3:制备检测乙肝核心抗体的均相免疫检测试剂盒

[0222] (1) 供体和受体的制备

[0223] 用作本发明的受体是按照专利PCT/US2010/025433中记载的实施例来制备的,其与重组乙肝核心抗原结合连接后的结构为:重组乙肝核心抗原-BSA-(二甲基噻吩)-(BHHCT);

[0224] 供体是按照专利US5780646的实施例所述的方法将200g叶绿素A放入200nm的羧基

改性的乳胶颗粒中,并将链霉亲和素包被在表面以形成本发明所述的供体。

[0225] (2) 配制乙肝核心抗体的校准品;

[0226] (3) 将重组乙肝核心抗原与受体相结合,获得与重组乙肝核心抗原相结合的受体;

[0227] (4) 取特异性识别人免疫复合物的第一抗体(实施例1制备的特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体和实施例2制备的特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体),然后用生物素标记特异性识别人免疫复合物的第一抗体,获得与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体。其中,利用生物素标记特异性识别人免疫复合物的第一抗体的方式为:

[0228] 将第一抗体稀释到1mg/ml并透析至0.1mol/L的碳酸氢钠缓冲液(pH 8.0),换液3次,获得第一抗体溶液;用1ml DMSO溶解1mg的NHS-Biotin,获得NHS-Biotin溶液。向1ml第一抗体溶液加入120 μ l NHS-iotin溶液,在室温下持续搅拌,保温2-4小时;加入9.6 μ l 1mol/L的NH₄Cl溶液,室温下搅拌10分钟,在4 $^{\circ}$ C下用PBS充分透析,以除去游离的生物素。

[0229] (5) 用链霉亲和素包被供体,获得与链霉亲和素结合的供体;

[0230] (6) 配制与重组乙肝核心抗原相结合的受体的稀释液、与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体的稀释液以及与链霉亲和素相结合的供体的稀释液;

[0231] (7) 用相应的稀释液分别稀释与重组乙肝核心抗原相结合的受体、与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体以及与链霉亲和素相结合的供体;稀释后的特异性识别人免疫复合物的第一抗体的浓度为2 μ g/ml;

[0232] (8) 分装上述稀释后的与重组乙肝核心抗原相结合的受体、与生物素相结合的特异性识别人免疫复合物的第一抗体以及与链霉亲和素相结合的供体,最后将各组分组装为检测乙肝核心抗体的均相免疫检测试剂盒。

[0233] 实施例4:利用检测乙肝核心抗体的均相免疫检测试剂盒检测乙肝核心抗体

[0234] (1) 试剂盒的种类

[0235] 实施例3制备的试剂盒:含与生物素结合的特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体(biotin-ICMab)的试剂盒;含与生物素结合的特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体(biotin-ICMab)的试剂盒。

[0236] 对照试剂盒:含生物素标记的普通羊抗人IgG(GxH)的试剂盒,其中对照试剂盒的制备方法同实施例3。

[0237] (2) 间接法检测乙肝核心抗体

[0238] 试剂盒中的检测试剂包括:与重组乙肝核心抗原结合的受体,与生物素结合的特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体(biotin-ICMab),与生物素结合的特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体(biotin-IC Pab),与生物素结合的羊抗人IgG抗体(biotin-GxM),与链霉亲和素结合的供体,乙肝核心抗体的阳性血清,乙肝核心抗体的阴性血清。试剂的工作浓度如表4所示。

[0239] 表4:检测试剂的工作浓度

[0240]	试剂	与重组乙肝核心抗原结合的受体	biotin-ICMab	biotin-IC Pab	biotin-GxM
	工作浓度	50ug/ml	2 ug/ml	2 ug/ml	2 ug/ml

[0241] 检测步骤如下：向反应板的反应孔中依次加入25ul与重组乙肝核心抗原结合的受体，25ul生物素标记抗体 (biotin-ICMab、biotin-IC Pab或biotin-GxM) 和25ul待检测人血清，然后将反应板放入光激化学发光免疫检测仪中。设置第一步温育时间15min，自动加入链霉亲和素结合的供体，第二步温育时间10分钟，最后进行光激发并进行读数，记录化学发光值，检测结果如表5所示。

[0242] 表5：待测血清的化学发光值

乙肝核心抗体血清值	biotin-IC Mab	biotin-IC Pab	biotin-GxM
阴性血清	541	458	478
12.5 PEIU	875	785	490
58.4 PEIU	5964	2541	512
568.8 PEIU	98751	28451	1201

[0244] 从表5可知，本发明所述试剂盒实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用，对阳性样本和阴性样本的区分度明显、灵敏度高，尤其是含特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体的试剂盒。含特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体的试剂盒在样本血清中乙肝核心抗体的浓度为12.5PEIU时，仍能与阴性血清样本明显区分。

[0245] 应当注意的是，以上所述的实施例仅用于解释本发明，并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述，但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇，而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改，以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例，但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例，相反，本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

专利名称(译)	一种免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109991405A	公开(公告)日	2019-07-09
申请号	CN201711472827.2	申请日	2017-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司 北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司 北京科美生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司 北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	陈英豪 赵卫国 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
发明人	陈英豪 赵卫国 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	方莉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域的一种免疫检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括特异性识别人免疫复合物的第一抗体；所述第一抗体能够特异性识别人免疫复合物中与抗原结合后的目标抗体，但不识别游离的人IgG以及游离的目标抗体。所述特异性识别人免疫复合物的第一抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体，且利用含该抗体的试剂盒实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用。

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
10000	0.1074	0.5108	0.3250	0.3951	0.2055	0.1487	0.1243	0.2141