



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03127631.8

[43] 公开日 2004年3月10日

[11] 公开号 CN 1480731A

[22] 申请日 2003.7.16 [21] 申请号 03127631.8

[71] 申请人 吉林大学

地址 130021 吉林省长春市新民大街8号

[72] 发明人 魏景艳 房学迅 李善玉 罗贵民

[74] 专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任公司

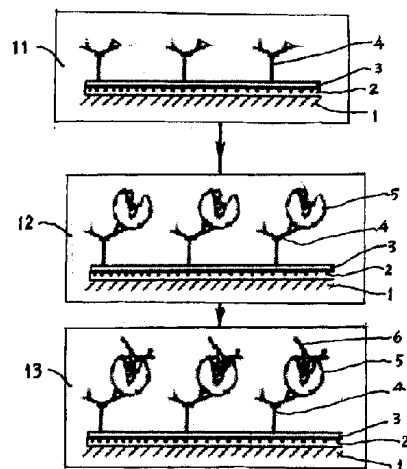
代理人 王恩远

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称 夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法

### [57] 摘要

本发明的夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法属免疫检测领域，特别涉及一种定量检测分子量在20kDa以下蛋白质及肽类的方法。是以镀有金膜的载玻片或三棱镜为检测基片，经组装体形成、第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成、第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成、共振波长检测等过程完成的。待测抗原是胰岛素、bFGF、T<sub>3</sub>或T<sub>4</sub>等；相应的第一抗体和第二抗体应为特异性抗每种待测抗原的单克隆第一抗体和第二抗体，且它们具有互补性。本发明可实时监测生物分子的动态反应过程，能简易直接检测待测物浓度的变化；灵敏度高，无背景干扰；试剂成本低。第二抗体的结合产生了更强的光学信号，发挥了生物学放大作用。



1、一种夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法，在检测基片上，经组装体形成、第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成、第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成、共振波长检测过程完成的；所说的组装体形成是将抗待测小分子蛋白或肽类的单克隆抗体作为第一抗体固定在传感膜上；所说的第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成是指加入待测样品后，检测基片上的第一抗体与待测样品中的待测抗原形成第一抗体-抗原二元免疫复合物；所说的第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成是指向样品池中加入另一株与第一抗体互补的抗待测的小分子蛋白或肽类单克隆抗体作为第二抗体时，检测基片上的第一抗体-抗原二元免疫复合物通过抗原与第二抗体特异性结合形成第一抗体-抗原-第二抗体三元免疫复合物；其特征在于，所说的检测基片是镀有金膜作传感膜的载玻片或三棱镜；所说的待测抗原是分子量低于 20kDa 的小分子蛋白质或肽类；所说的共振波长检测是根据第二抗体引起的共振波长的变化，与标准曲线对比，计算被测样品中的待测小分子蛋白或肽类含量。

2、按照权利要求 1 所述的夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法，其特征在于，所说的待测抗原是胰岛素、碱性纤维母细胞生长因子、三碘甲状腺原氨酸或四碘甲状腺原氨酸；所说的第二抗体，是用胶体金颗粒标记的第二抗体。

3、按照权利要求 1 或 2 所述的夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法，其特征在于，所说的组装体形成是，第一抗体通过中间连接层分子连到金膜上，中间连接层分子是葡萄球菌蛋白 A 或亲和素。

## 夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法

### 技术领域

本发明属免疫检测领域，涉及一种定量检测分子量在 20kDa 以下蛋白质或肽类的方法，特别是涉及一种建立在传感膜上的夹心免疫分析法。

### 背景技术

与本发明相近的现有技术是 1998 年公开报道的一篇以质脂体为中间层的双单克隆抗体夹心法检测微量干扰素的一种灵敏的方法。见 Wink T, Anal Chem., 1;70(5):827-32. Liposome-mediated enhancement of the sensitivity in immunoassays of proteins and peptides in surface plasmon resonance spectrometry. 的文章。这个分析方法是在一个约 20nm 厚、表面镀有金膜的聚苯乙烯薄层上通过表面等离子体共振 (SPR) 技术完成的。经过包被捕捉抗体 (第一抗体)，加入被测标本，加入生物素化的检测抗体 (第二抗体)，最后再加入亲和素和生物素化质脂体等过程，通过监测最后一步所引起的共振波长的变化检测被测标本中干扰素的含量。其中，质脂体发挥了生物学放大作用。所有反应均是在 pH7.4、10mM 磷酸盐缓冲液(PBS)中进行的，避免不同溶液产生不同的折光性，影响检测结果。

现有技术是加入能通过亲和素-生物素的亲和作用连接到第二抗体上的质脂体放大光学反应信号来提高检测灵敏度的，因此操作烦琐、费时、检测周期长，即使在都使用标记粒子的情况下，质脂体与抗体的连接也较胶体金颗粒标记抗体难度大。

### 发明内容

随着表面等离子体共振 (SPR) 技术的发展，通过使用特异性抗体建立基于传感膜上的免疫分析，检测相应抗原，成为近几年研究的热点，是继酶联免疫分析法、化学发光酶免疫分析法，放射免疫分析之后的一种新型分析方法。本发明要解决的技术问题是提供一种定量检测小分子蛋白质及肽类 (分子量在 20kDa 以下) 的新型夹心免疫检测法，所用抗体不标记或仅用胶体金标记，操作简单易行，不需进一步的显色反应，能直接显示检测结果。

本发明是以传感膜，可以是镀有金膜的载玻片或三棱镜为检测基片，经组装体的形成、第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成、第一抗体-抗原-第二抗体夹心

三元免疫复合物的形成、共振波长检测等过程完成的。所说的组装体的形成是将一株抗待测小分子蛋白或肽类的单克隆抗体作为第一抗体（即捕捉抗体）固定在传感膜上，构成具有特异免疫活性的组装体；所说的第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成是指加入待测样品后，检测载体上的第一抗体与待测样品中的待测抗原形成第一抗体-抗原二元免疫复合物；所说的第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成是指向样品池中加入另一株与第一抗体互补的抗待测小分子蛋白或肽类的单克隆抗体作为第二抗体（即检测抗体）时，检测基片上的第一抗体-抗原二元免疫复合物通过抗原与第二抗体特异性结合形成第一抗体-抗原-第二抗体三元免疫复合物；所说的待测样品是分子量低于 20kDa 的小分子蛋白质或肽类；所说的共振波长检测是根据第二抗体引起的共振波长的变化，与标准曲线对比，计算被测样品中的待测小分子蛋白或肽类含量。

第二抗体的使用，明显提高了免疫检测的灵敏度。

上述的待测的分子量低于 20kDa 的小分子蛋白质或肽类，可以是胰岛素、碱性纤维母细胞生长因子、三碘甲状腺原氨酸（T<sub>3</sub>）、四碘甲状腺原氨酸（T<sub>4</sub>）等。相应的第一抗体和第二抗体应为特异性抗每种待测抗原的单克隆第一抗体和第二抗体，且这两株单抗应识别待测抗原分子上不同的抗原表位，即具有互补性，能同时结合到同一抗原分子上。它们分别是抗胰岛素单克隆抗体，抗碱性纤维母细胞生长因子单克隆抗体，抗 T<sub>3</sub> 单克隆抗体，抗 T<sub>4</sub> 单克隆抗体等。使用不同的单克隆抗体，就可检测不同的相应的待测抗原，即不同的小分子蛋白或肽类。

本发明中所提到的第二抗体可以是非标记第二抗体，也可以是用胶体金颗粒标记的第二抗体。

上述的组装体的形成过程可以是将第一抗体直接连到金膜上，也可以通过中间连接层分子间接连到金膜上，中间连接层分子可以是葡萄球菌蛋白 A 或亲和素，它们能起到生物学放大作用，提高检测灵敏度。

本发明的三层夹心结构的样品及其形成过程可以用图 1 形象地表述。所说的三层夹心结构就是抗体/抗原/抗体的双单抗两点式三层分子的夹心结构。图 1 中，1 为检测基片，2 为金膜，3 为中间连接层分子（葡萄球菌蛋白 A 或亲和素），4 为第一抗体，5 为待测样品的抗原，6 为第二抗体。三层夹心结构中，第一层为第一抗体，第二层为待测样品的抗原，第三层为第二抗体。图 1 中，11 为组装

体的形成, 12 为第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成, 13 为第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成。

与普通生物传感器方法相比, 本法具有以下优点: (1) 三层夹心免疫复合物形成时, 第三层即第二抗体的结合产生了更强的光学信号, 发挥了生物学放大作用, 这是由于抗体的分子量 (160KDa) 明显大于抗原 (低于 20kDa) 分子量, 所引起的光学反应信号随之增强至少 10 倍, 因此, 检测灵敏度较相应的直接法提高 10-100 倍; 同理, 胶体金颗粒标记的第二抗体能发挥更大的生物学放大作用, 因此, 检测灵敏度较相应的直接法提高 100-1000 倍; (2) 本法尤其适用于用直接传感法不能检出的小分子蛋白质及肽类。

与常规免疫分析法相比本法具有: 第一, 实时监测性, 可实时监测生物分子的动态反应过程, 得到分子间有无结合, 结合的强度和速度, 解离的快慢, 结合位点分布等信息; 第二, 简易性, 不需标记检测中所涉及的任何生物分子或仅使用胶体金标记抗体, 不需显色底物, 直接检测待测物浓度的变化; 第三, 第二抗体的结合产生了更强的光学信号, 发挥了生物学放大作用, 因此灵敏度高, 无背景干扰; 第四, 试剂成本低。

与背景技术相比, 共同的优点是可实时监测生物分子的动态反应过程, 能简易直接检测待测物浓度的变化; 灵敏度高, 无背景干扰; 试剂成本低。本发明的方法使用不标记或用胶体金颗粒标记的第二抗体, 省去了加入亲和素和生物素化质脂体的过程, 因此具有操作简单、省时、检测周期短等优点; 能定量检测分子量在 20kDa 以下小分子蛋白质及肽类。

#### 附图说明

图 1 是本发明的三层夹心结构的样品及其形成过程示意图。

图 2 是本发明的结合到金膜上的抗 TnC 单克隆第二抗体产生的光学反应信号图。

图 3 是本发明的结合到金膜上的抗碱性纤维母细胞生长因子 (bFGF) 单克隆第二抗体产生的光学反应信号图。

图 4 是本发明的结合到金膜上的抗 T<sub>3</sub> 单克隆第二抗体产生的光学反应信号图。

图 5 是本发明的结合到金膜上的抗 T<sub>4</sub> 单克隆第二抗体产生的光学反应信号

图。

### 具体实施方式：

下面结合实施例对本发明做进一步的阐述，而不是要以此对本发明进行限制。

#### 实施例 1：兔骨骼肌肌钙蛋白 C (TnC) 的夹心免疫传感法检测

##### (一) 具有免疫学活性的组装体的形成

- 1) 金膜的活化：先向样品池中加入用乙醇配制 6.7 mmol/L 的二巯基乙酸或巯基丙酸；反应 15min 后加入 0.87mol/L 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 0.52mol/L 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 溶液反应 15min，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗流通池 3 次。
- 2) 以下每一步反应完成之后(共振波长达稳定值)，用磷酸盐缓冲液 (PBS, 10mmol/L, pH7.4, 含 NaCl 8.5g/L) 冲洗流通池 3 次，清除非特异性吸附，然后注入下一步反应试剂。除特异性抗 TnC 单克隆抗体反应 30min 外，其余每步 20min 即可完成。加入用 PBS 配制的 0.2g/L 的亲合素；反应完毕后加入 5g/L 的牛血清蛋白 (BSA) 以封闭金膜上剩余的能与蛋白分子反应的位点。
- 3) 加入 20 倍稀释的生物素化特异性抗 TnC 单克隆第一抗体。

##### (二) 第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成

加入待测标本，如果其中含有相应的待测抗原，则与金膜表面的抗 TnC 单克隆第一抗体特异性结合，形成第一抗体-TnC 的二元复合物。由于待测抗原分子量较小 (低于 20kDa)，当待测抗原浓度低时，这一反应引起的光学信号变化不明显，常常检测不到。

##### (三) 第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成

第二抗体是能与第一抗体同时结合到同一 TnC 分子上的另一株单抗，两者结合 TnC 分子上的不同抗原表位，因此，加入的第二抗体能与金膜上的 TnC 抗原结合，形成第一抗体-TnC-第二抗体三层夹心的三元免疫复合物。

夹心免疫传感器的测定原理是通过检测结合到金膜表面的第二抗体分子产生的光学信号来实现对被测物的检测的。结合到金膜表面第二抗体分子的厚度及密度不同，产生不同强度的光学信号，结合到金膜表面的第二抗体分子的厚度及

密度越大，产生的光学反应信号越强。与普通直接传感法比较，夹心法的灵敏度提高了 10 倍，表明第二抗体的结合产生了更强的光学信号，发挥了生物学放大作用，这是由于抗体的分子量（16KDa）明显大于 TnC 抗原（1.8kDa）分子量。

在实施例 1 中，第二抗体的加入使共振波长增加了 2.8nm（见图 2），可以判断样品中含有 TnC。通过与标准参考物对比可求出样品中 TnC 的浓度。标准参考物可以按下述过程得到：将已知 TnC 含量的标准溶液配制成由低到高 5 种不同浓度，用与待测标本相同的检测方法，即重复前面（一）、（二）步骤的操作，测定每种浓度的标准溶液引起的共振波长变化，以 TnC 浓度的对数值为横坐标，共振波长增加的对数值为纵坐标，绘制标准曲线。

#### 实施例 2：兔骨骼肌钙蛋白 C(TnC) 夹心免疫传感法检测的特异性

为了说明该夹心免疫检测结果的特异性，用 BSA 代替 TnC 作为待检样品进行免疫检测，重复实施例 1 的全过程。实施例 2 中，所用的两株抗 TnC 单克隆抗体与 BSA 是非配对抗原抗体或非相关抗体，不具有选择性的识别作用，因此，不能特异性结合，也不能形成三层夹心的免疫复合物，即不能产生相应的光学信号，共振波长无变化，说明待检样品中不含有 TnC，样品中的非相关蛋白不会引起非特异性反应，该夹心免疫检测法具有高度特异性。

#### 实施例 3：碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)的夹心免疫传感法检测

如同实施例 1 的各步操作，不同的是第一抗体、第二抗体为抗 bFGF 的单克隆抗体，待检抗原只能是 bFGF。同样将含有 bFGF 的标本作为待检样品，通过检测可测出样品中 bFGF 的含量。图 3 为实施例 3 的检测结果，抗 bFGF 第二单克隆抗体的结合使共振波长增加了 2.9nm，可以判断样品中含有 bFGF，通过与标准参考物对比可求出样品中 bFGF 的浓度。

#### 实施例 4：T<sub>3</sub> 的夹心免疫传感法检测

如同实施例 1 的各步操作，不同的是第一抗体、第二抗体为抗 T<sub>3</sub> 的单克隆抗体，待检抗原只能是 T<sub>3</sub>。同样将含有 T<sub>3</sub> 的标本作为待检样品，通过检测可测出样品中 T<sub>3</sub> 的含量。图 4 为实施例 4 的检测结果，抗 T<sub>3</sub> 第二单克隆抗体的结合使共振波长增加了 3.6nm，可以判断样品中含有 T<sub>3</sub>，通过与标准参考物对比可求出样品中 T<sub>3</sub> 的浓度。

#### 实施例 5：T<sub>4</sub> 的夹心免疫传感法检测

如同实施例 1 的各步操作，不同的是第一抗体、第二抗体为抗 T<sub>4</sub> 的单克隆抗体，待检抗原只能是 T<sub>4</sub>。同样将含有 T<sub>4</sub> 的标本作为待检样品，通过检测可测出样品中 T<sub>4</sub> 的含量。图 5 为实施例 5 的检测结果，抗 T<sub>4</sub> 第二单克隆抗体的结合使共振波长增加了 3.8nm，可以判断样品中含有 T<sub>4</sub>，通过与标准参考物对比可求出样品中 T<sub>4</sub> 的浓度。

**实施例 6：将第二抗体用胶体金颗粒标记后使用**

上述 5 个实施例中均可将第二抗体用胶体金颗粒标记后使用，其他条件不变，这时该夹心免疫传感检测法的灵敏度较普通传感法（直接法）提高 100-1000 倍。这里除第二抗体变为胶体金标记抗体外，其他方法及操作同上述各实施例，不再举例。

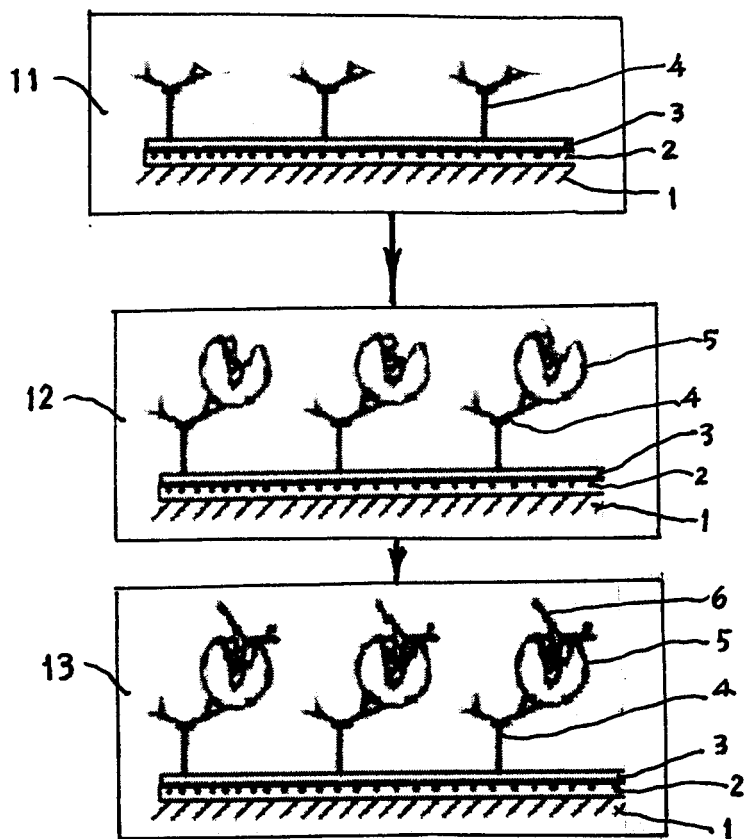


图 1

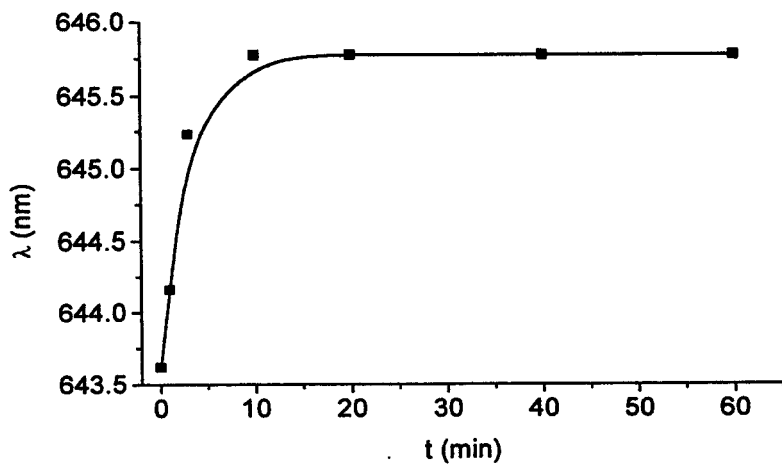


图 2

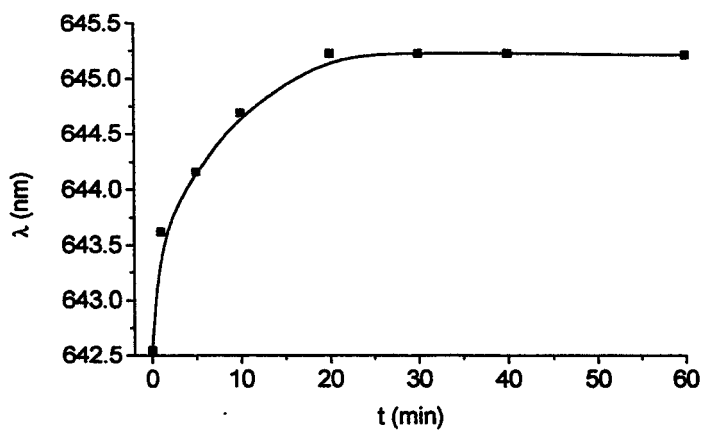


图 3

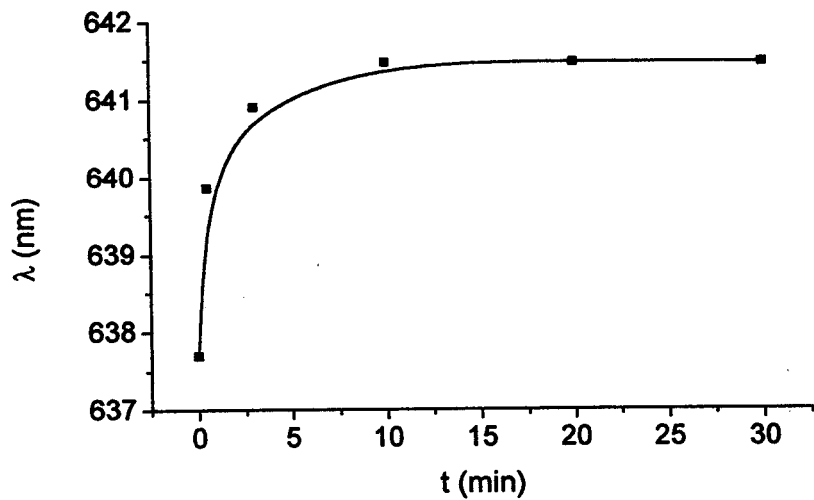


图 4

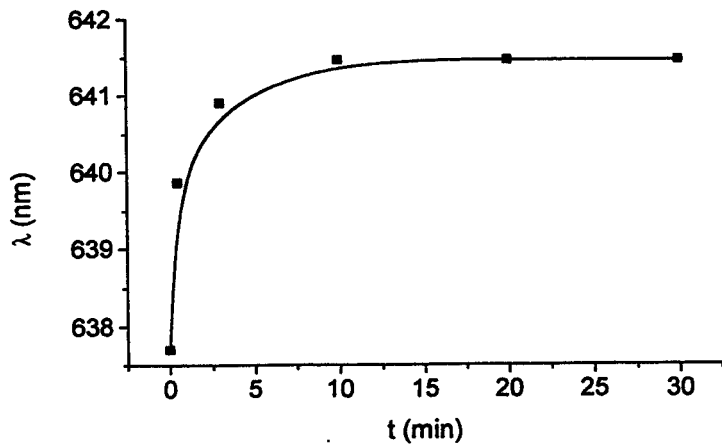


图 5

专利名称(译)	夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1480731A</a>	公开(公告)日	2004-03-10
申请号	CN03127631.8	申请日	2003-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	魏景艳 房学迅 李善玉 罗贵民		
发明人	魏景艳 房学迅 李善玉 罗贵民		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	王恩远		
其他公开文献	CN1193232C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的夹心免疫传感法检测小分子蛋白质及肽类的方法属免疫检测领域，特别涉及一种定量检测分子量在20kDa以下蛋白质及肽类的方法。是以镀有金膜的载玻片或三棱镜为检测基片，经组装体形成、第一抗体-抗原二元免疫复合物的形成、第一抗体-抗原-第二抗体夹心三元免疫复合物的形成、共振波长检测等过程完成的。待测抗原是胰岛素、bFGF、T3或T4等；相应的第一抗体和第二抗体应为特异性抗每种待测抗原的单克隆第一抗体和第二抗体，且它们具有互补性。本发明可实时监测生物分子的动态反应过程，能简易直接检测待测物浓度的变化；灵敏度高，无背景干扰；试剂成本低。第二抗体的结合产生了更强的光学信号，发挥了生物学放大作用。

