



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102809648 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201110144491. 3

(22) 申请日 2011. 05. 31

(71) 申请人 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心

地址 518045 广东省深圳市福田区富强路 1011 号

(72) 发明人 张恒 汤慕瑾 吕敬章 谢丽琪
岳振峰 万志刚 蓝芳 黄李华
范放 洪小柳 蔡伟增 陈昊翰

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/576(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

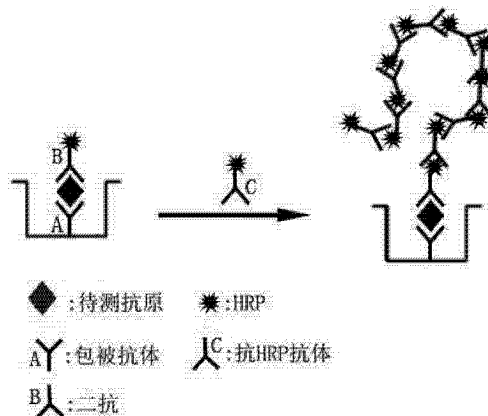
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种酶信号循环放大高灵敏免疫检测方法

(57) 摘要

本发明涉及酶联免疫(ELISA)领域,特别是一种抗 HRP 多抗-HRP 复合物应用于 ELISA 技术,从而获得酶信号循环放大。基于酶信号循环放大免疫检测方法,适合于各种类型的基于酶信号放大的免疫检测系统,该免疫检测系统的优势是能够最大程度上提高其检测灵敏度。



1. 一种基于酶信号循环放大免疫检测方法的构建,其特征在于:采用抗 HRP 多抗 -HRP 复合物进行酶信号的循环放大,而不仅仅限于 HRP,也可是其他类型的酶如碱性磷酸酶 AP 等。

2. 根据权利要求 1 所述的酶信号循环放大免疫检测方法,是在传统 ELISA 检测模式上再进行酶信号的循环放大,传统的常见检测模式有双抗体夹心测抗原、双抗原夹心测抗体、间接法测抗体、竞争法测抗体 \ 抗原、亲和素 - 生物素 -ELISA 等不同类型的 ELISA 检测模式等等。

3. 一种如权利要求 1,2 所述的酶信号循环放大免疫检测方法,其特征在于使用一种抗 HRP 多抗 -HRP 复合物(或等效的其他类型酶对应的复合物),其所采用的是抗 HRP 的多抗,并与 HRP 形成不饱和类型复合物,此复合物具有 HRP 酶活性,同时还能与 HRP 进行结合。

4. 根据权利要求 1 所述的抗 HRP 多抗 -HRP 复合物的制备方法,其特征在于用纯化的 HRP 免疫兔,得到含有抗 HRP 抗体的兔血清;先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法从兔的血清中初步纯化免疫球蛋白 IgG,再用 ProteinA-Sepharose 亲和层析柱进一步纯化抗 HRP 的 IgG, SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定分离纯化的抗 HRP 多抗。

5. 取上述纯化后的抗 HRP 多抗,加入一定量的 HRP 形成不饱和的抗 HRP 多抗 -HRP 复合物。

6. 根据权利要求 1,2 所述的酶信号循环放大免疫检测方法,其特征在于能够实现酶信号的循环放大,大大提高其检测灵敏度,而不限制于采用何种 ELISA 检测模式。

7. 一种如权利要求 1,2 所述的酶信号循环放大方法,适用于各类 ELISA 试剂盒的研制,所要求是一种基于酶信号循环放大的新型 ELISA 检测系统。

8. 一种如权利要求 1 所述的抗 HRP 抗体,属于多抗,而不局限于何种类型的多抗,即可为兔多抗,也可为鼠多抗、羊多抗等。

9. 一种权利要求 1 所述的酶信号循环放大免疫检测系统在临床检验、食品安全、动物疫病等相关领域的应用。

一种酶信号循环放大高灵敏免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,特别涉及一种基于酶信号循环放大超灵敏免疫检测方法,属于酶联免疫(ELISA)技术领域。

背景技术

[0002] 酶联免疫(ELISA)技术是现代免疫分析中较为重要的一项技术,尤其是基于ELISA技术的各种类型的初筛试剂盒在临床检验、食品安全领域得到广泛的应用。这项检测技术中有3项必要的试剂:①固相的抗原或抗体;②酶标记的抗原或抗体;③酶作用的底物。根据试剂的来源和标本的性状以及检测的具备条件,可设计出各种不同类型的检测方法,如双抗体夹心测抗原、双抗原夹心测抗体、间接法测抗体、竞争法等模式。ELISA技术检测不同的项目,其检测灵敏度和相应的抗原及抗体有着紧密联系,而随着检验检疫要求越来越严格,对方法灵敏度的要求越来越高,而基于传统的ELISA技术在灵敏度方面往往提高空间有限,也只能依赖提高抗原抗体的亲和力,从而间接提高其检测灵敏度。

发明内容

[0003] 针对当前ELISA技术发展趋势的需求:如何有效的提供其检测灵敏度,本发明所要解决的技术问题就是在原有的ELISA检测体系基础之上,进行创新型设计以获得更高的检测灵敏度。本发明的创新主要在于在原有的ELISA检测体系中引入“抗酶抗体-酶标记复合物”如兔抗辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)多抗-HRP复合物,兔抗HRP-碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)复合物等,以达到更高的检测灵敏度。

[0004] 本发明的目的在于提供一种基于酶信号循环信号放大的ELISA检测系统。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一类“抗酶抗体-酶标记物”制备方法及其应用于传统ELISA技术中。

[0006] 本发明的再一目的是利用一类“抗酶抗体-酶标记物”实现传统ELISA中酶信号的循环放大,从而提高检测灵敏度。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案实现:一类抗酶抗体-酶标记物的制备并应用于传统ELISA技术中。针对HRP显色体系,制备抗HRP多抗-HRP复合物;针对AP显色体系,制备抗AP多抗-AP复合物;也可能制备其他类型显色酶抗体酶标复合物及其不同类型显色酶抗体-酶交叉制备的复合物,此类复合物能够实现酶信号的循环放大,提供传统ELISA检测体系的灵敏度,本说明书以HRP为例进行来描述本发明的设计模型。

[0008] 本发明的技术方案是首先通过多抗制备技术获得抗HRP多抗,并与一定量的HRP进行亲和反应形成抗HRP多抗-HRP复合物。选取某一ELISA检测模型如双抗夹心检测HBsAg建立基于酶信号循环放大的新型ELISA检测体系。

[0009] 上述抗HRP多抗-HRP复合物的制备流程及检测系统构建具体可以包括下述步骤:

(1)、用纯化的HRP免疫兔,得到含有抗HRP抗体的兔血清;先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法从兔

的血清中初步纯化免疫球蛋白 IgG,再用 ProteinA-Sepharose 亲和层析柱进一步纯化抗 HRP 的 IgG, SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定分离纯化的抗 HRP 多抗;(2)、取上述纯化后的抗 HRP 多抗,加入一定量的 HRP 形成不饱和的抗 HRP 多抗-HRP 复合物,此复合物不仅具有 HRP 酶活性,而且仍然具有与 HRP 酶反应的活性位点;(3)、应用举例 1:双抗夹心法检测乙肝表面抗原(HBsAg)的基础之上,引入抗 HRP 多抗-HRP 复合物,在 ELISA 显色步骤之前加入上述抗 HRP 多抗-HRP 复合物反应 30min 后进行洗涤,再进行酶显色步骤;(4)、应用举例 2:间接法测口蹄疫病毒(FMDV)抗体 ELISA 试剂盒基础之上,引入抗 HRP 多抗-HRP 复合物,在 ELISA 显色步骤之前加入上述抗 HRP 多抗-HRP 复合物反应 30min 后进行洗涤,再进行酶显色步骤。

[0010] 本发明提供了抗 HRP 多抗-HRP 复合物的制备方法,该复合物能够用于 ELISA 检测体系中,形成基于酶信号循环放大免疫检测系统,能够远远的提高检测的灵敏度。

附图说明

[0011] 图 1 酶信号循环放大应用实例 1- 双抗体夹心 ELISA 模式。

[0012] 图 2 酶信号循环放大应用实例 2- 间接法测抗体 ELISA 模式。

具体实施方式

[0013] 实施例是对本发明所提供的抗 HRP 多抗-HRP 复合物的制备及应用到酶信号循环放大系统应用举例的进一步说明,但发明的实施方式不限于此,对于其他方式的 ELISA,该发明策略同样适用。

[0014] 实施例 1 抗 HRP 多抗-HRP 复合物的制备

(1) 油包水抗原乳化剂的制备

用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2mL 混合 2 mg 纯化 HRP,用匀浆器混合 2 小时,将制好的乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中,若一滴乳化剂状态完整地停留在水面上,而不扩散,表明形成稳定的油包水抗原乳化剂。

[0015] (2) 免疫新西兰大白兔

选取 4 周大的,体重约 1.5Kg 的健康新西兰大白兔 2 只。先将新西兰大白兔背部的毛小心剪去,然后取 600 μ L 制备好的油包水抗原乳化剂,用微量注射器多位点地进行皮下注射,一只动物背部两侧注射总数约为 8~10 点,使抗原能缓慢扩散,每隔 1~2 周免疫一次,观察注射点是否红肿,如果糜烂可用紫药水收干。在免疫 3-4 次后,从兔子的耳缘静脉抽血约 1mL,离心 10min 后,得血清可进行效价鉴定。共进行 6 次免疫,在末次免疫后 5 天后采用颈动脉放血法取血。

[0016] (3) 颈动脉放血法

在兔颈外侧做皮肤切口,拉开皮肤后可见斜行的胸锁乳突肌,将此肌钝性分离并推向后方,即可见到淡红色有弹性的总动脉。将此动脉轻轻游离(连同与之同行的迷走神经),用丝线将远心端结扎,近心端用止血钳夹住,另一止血钳夹住动脉迷走神经,用以固定。沿结扎处剪断血管,用固定止血钳将断端钳住,插入输血针管,慢慢打开夹持的止血钳,动脉血立即通过输血针管流入瓶中。采用室温自然凝固分离抗血清,然后放置 37 $^{\circ}$ C 1 小时,再 4 $^{\circ}$ C 过夜,待凝块收缩,4000rpm 离心 15 分钟,收集上清。

[0017] (4) 抗血清的纯化

饱和硫酸铵溶液:取 500ml 蒸馏水加热至 70 ~ 80℃,将 400g 硫酸铵溶于其中,搅拌 20min,冷却。待硫酸铵结晶沉于瓶底,其上清即为饱和硫酸铵。在使用前用 28% 氨水调 pH7.0。用 55% 饱和硫酸铵提取:血清 1 份加生理盐水 1 份混匀,然后逐滴加入饱和硫酸铵 2 份中,边加边搅拌,防止形成团块降低沉淀物的特异性。混匀后静置 30min 或置 4℃ 冰箱过夜。低温高速 10 000/min 离心 10min,将上清液(含白蛋白)弃去,取沉淀物(含球蛋白)溶于少量生理盐水中。

[0018] 用 33% 饱和硫酸铵提取:将上述提取物生理盐水溶液 2 份加 1 份饱和硫酸铵。然后再 10 000/min 离心,其余操作同上。用 33% 饱和硫酸铵重复上述步骤提取一次。

[0019] 将提取物装入透析袋,在生理盐水中透析,以除去其中所含的硫酸铵。放 -20℃ 冰箱保存。按照 ProteinA-Sepharose 亲和层析柱纯化试剂盒操作说明书进行抗体的进一步纯化。并采用 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定分离纯化的抗 HRP 多抗。

[0020] (5) 抗 HRP 抗体-HRP 复合物的制备

取纯化好的 HRP 抗体 10mg,加入一定量的 HRP,二者亲和而成不饱和抗 HRP 抗体-HRP 复合物,装入透析袋,在生理盐水中透析,放 -20℃ 冰箱保存。

[0021] 实施例 2 酶信号循环放大高灵敏免疫检测乙肝表面抗原系统(双抗体夹心测抗原)

(1) 材料准备

HBsAg 包被板:取抗 HBsAg 多抗,用 PH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释终浓度 5-8 ug /ml,包被体积为 100 ~ 150ul/孔。包被条件 4° C 过夜。1%BSA,0.01M PBS,PH7.4,37° C 封闭 2h,甩干备用。

[0022] 抗 HBsAg 酶结合物:①取 5 mg HRP 溶于 0.5ml 双馏水中,加入新配制的 0.06 Mol/L NaIO₄ 水溶液 0.5 ml,混匀,置 4 °C 30 min ;② 取出后加入 0.16 Mol/L 乙二醇水溶液 0.5 ml,室温放置 30 min ;③加入含 5mg 纯化 HBsAg 抗体的水溶液 1ml,混匀,并装入透析袋,对 0.05 Mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌透析 6 h,使之结合 ;④加入 NaBH₄ 溶液 (5 mg/ml)0.2 ml,混匀,置 4 °C 2 h ;⑤在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀,4 °C 30 min,离心,去上清,沉淀以少许 0.02 Mol/L pH7.4 PBS 液溶解,装入透析袋,以同样液体在 4 °C 透析除盐过夜 ;⑥次日取出离心,以除去不溶物,即得抗 HBsAg 酶结合物,以 0.02 Mol/L pH 7.4 PBS 液加至 5 ml ;⑦效价测定合格后,加入等量优质甘油,分装小瓶,低温保存。

[0023] 显色剂 A 液:醋酸钠 13.6g,柠檬酸 1.6g, H2O2 (30%) 0.3ml, dH2O 500ml ;

显色剂 B 液:EDTA-Na 0.2g,柠檬酸 0.95g,甘油 50ml, TMB(四甲基联苯胺) 0.2g

终止液:2M H₂SO₄ ;

20× 浓缩洗涤液:8 mM 磷酸钠,2mM 磷酸钾,0.14 M NaCl,100 mM KCl,0.05% Tween-20, pH 7.4。

[0024] (2) 操作步骤

取出抗体包被板,预留空白孔 1 孔、阴性对照 3 孔,阳性对照 2 孔,其余各孔每孔加入 50 μ L 待测样本。阴阳性对照每孔加入 50 μ L 对照血清。然后每孔加入 50 μ L 抗 HBsAg 酶结合物(不包括空白孔),空白孔空置。混匀后,37℃ 温育 30 分钟。用稀释好的洗涤液洗板

1 次,甩干后加入抗 HRP 抗体 -HRP 复合物 50 μ L/ 孔(稀释比 1000-10000),37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。用稀释好的洗涤液洗板 4 次,洗板时洗涤液应注满板孔,但不应溢出,每次注入洗涤液后应浸泡 15 秒。每孔先加入 50 μ L 显色剂 A 液,再加入 50 μ L 显色剂 B 液,混匀后,37 $^{\circ}$ C 避光温育 30 分钟。每孔加入 100 μ L 终止液,混匀。选择酶标仪测定波长为 450nm,参考波长 630nm,测定各孔吸收值。

[0025] 实施例 3 酶信号循环放大高灵敏免疫检测猪口蹄疫病毒抗体系统(间接法测抗体)

(1) 材料准备

包被抗原:取 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白,用 PH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释终浓度 3-10 μ g/ml,包被体积为 150 μ l/ 孔。包被条件 4 $^{\circ}$ C 过夜。5%脱脂奶粉,0.01M PBS,0.05% Tween20,PH7.4,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,甩干备用。

[0026] 酶标二抗:①取 5 mg HRP 溶于 0.5ml 双馏水中,加入新配制的 0.06 Mol/L NaIO_4 水溶液 0.5 ml,混匀,置 4 $^{\circ}$ C 30 min;②取出后加入 0.16 Mol/L 乙二醇水溶液 0.5 ml,室温放置 30 min;③加入含 5mg 二抗的水溶液 1ml,混匀,并装入透析袋,对 0.05 Mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌透析 6 h,使之结合;④加入 NaBH_4 溶液(5 mg/ml)0.2 ml,混匀,置 4 $^{\circ}$ C 2 h;⑤在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀,4 $^{\circ}$ C 30 min,离心,去上清,沉淀以少许 0.02 Mol/L pH7.4 PBS 液溶解,装入透析袋,以同样液体在 4 $^{\circ}$ C 透析除盐过夜;⑥次日取出离心,以除去不溶物,即得抗 HBsAg 酶结合物,以 0.02 Mol/L pH 7.4 PBS 液加至 5 ml;⑦效价测定合格后,加入等量优质甘油,分装小瓶,低温保存。

[0027] 显色剂 A 液:醋酸钠 13.6g,柠檬酸 1.6g, H2O2 (30%) 0.3ml, dH2O 500ml;

显色剂 B 液:EDTA-Na 0.2g,柠檬酸 0.95g,甘油 50ml, TMB(四甲基联苯胺) 0.2g

终止液:1M HCl;

20 \times 浓缩洗涤液:8 mM 磷酸钠,2mM 磷酸钾,0.14 M NaCl,100 mM KCl,0.05% Tween-20, pH 7.4。

[0028] (2) 操作步骤

取 PV1 抗原包被板,预留空白孔 1 孔、阴性对照 3 孔,阳性对照 2 孔,其余各孔每孔加入 50 μ L 待测样本。然后每孔加入 50 μ L 酶标二抗(不包括空白孔),空白孔空置。混匀后,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。用稀释好的洗涤液洗板 1 次,甩干后加入抗 HRP 抗体 -HRP 复合物 50 μ L/ 孔(稀释比 1000-10000),37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。用稀释好的洗涤液洗板 4 次,洗板时洗涤液应注满板孔,但不应溢出,每次注入洗涤液后应浸泡 15 秒。每孔先加入 50 μ L 显色剂 A 液,再加入 50 μ L 显色剂 B 液,混匀后,37 $^{\circ}$ C 避光温育 30 分钟。每孔加入 100 μ L 终止液,混匀。选择酶标仪测定波长为 450nm,参考波长 630nm,测定各孔吸收值。

[0029] 上述实施例为本发明的实施方式一部分,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化。均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

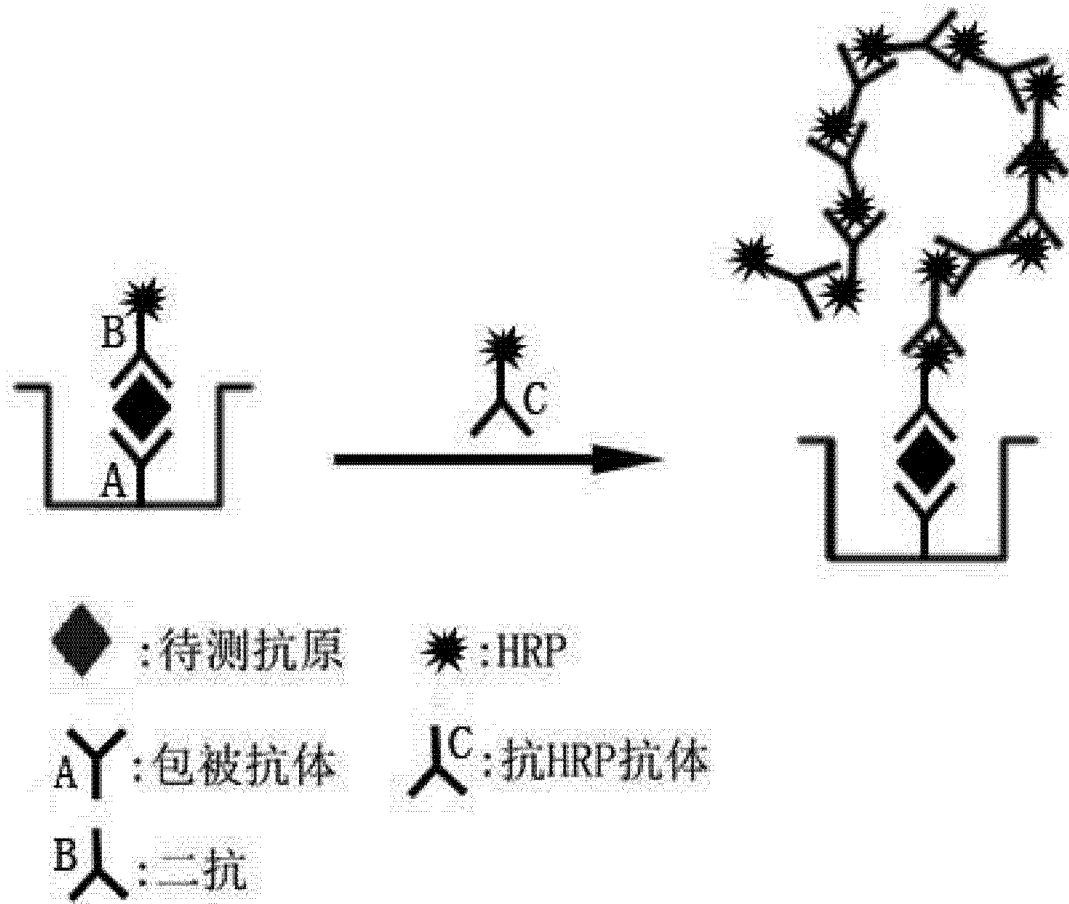


图 1

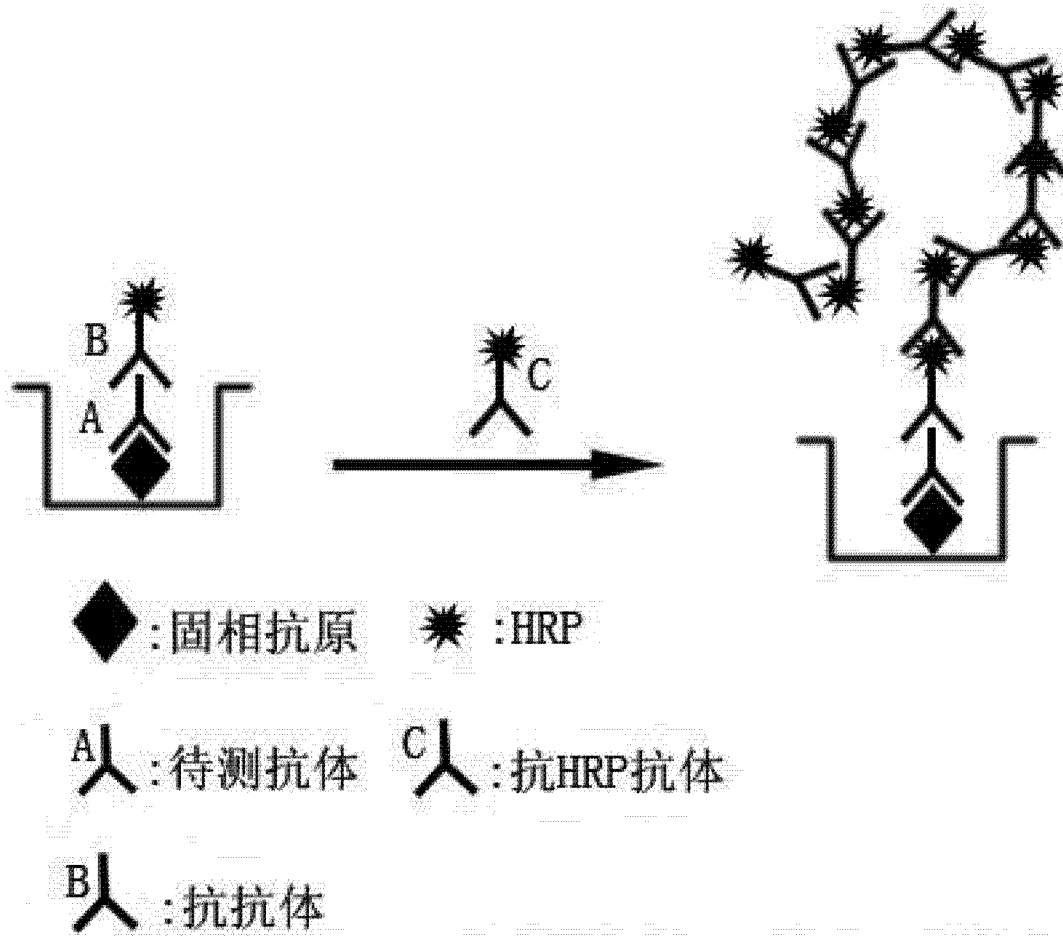
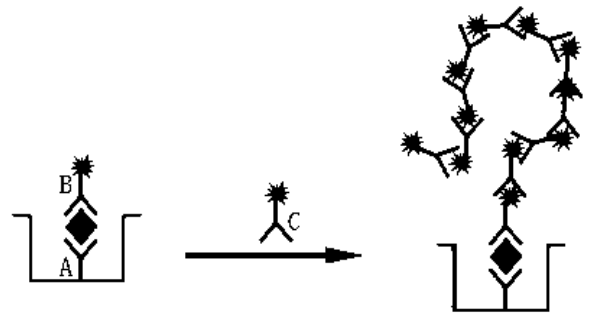


图 2

专利名称(译)	一种酶信号循环放大高灵敏免疫检测方法		
公开(公告)号	CN102809648A	公开(公告)日	2012-12-05
申请号	CN201110144491.3	申请日	2011-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心		
[标]发明人	张恒 汤慕瑾 吕敬章 谢丽琪 岳振峰 万志刚 蓝芳 黄李华 范放 洪小柳 蔡伟增 陈昊翰		
发明人	张恒 汤慕瑾 吕敬章 谢丽琪 岳振峰 万志刚 蓝芳 黄李华 范放 洪小柳 蔡伟增 陈昊翰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/576 G01N33/569		
其他公开文献	CN102809648B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及酶联免疫 (ELISA) 领域，特别是一种抗HRP多抗-HRP复合物应用于ELISA技术，从而获得酶信号循环放大。基于酶信号循环放大免疫检测方法，适合于各种类型的基于酶信号放大的免疫检测系统，该免疫检测系统的优势是能够最大程度上提高其检测灵敏度。



◆ : 待测抗原

★ : HRP

A Y : 包被抗体

C Y : 抗HRP抗体

B Y : 二抗