



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102721802 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201210233377. 2

说明书实施例 3、6.

(22) 申请日 2012. 07. 06

US 2011039256 A1, 2011. 02. 17, 全文.

US 2009181410 A1, 2009. 07. 16, 全文.

(73) 专利权人 深圳市易瑞生物技术有限公司
地址 518102 广东省深圳市宝安区西乡街道
桃花源科技创新园 11 号

王术皓. 环境中雌二醇等微量荷尔蒙物质的
免疫分析、化学发光分析研究. 《中国博士学位论
文全文数据库工程科技 I 辑》. 2011, (第 03 期),

(72) 发明人 朱海 李细清 李金峰

审查员 许珊萍

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事
务所 44268

代理人 刘文求 杨宏

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101315371 A, 2008. 12. 03, 权利要求 1、
2、8, 说明书实施例 1.

CN 101382541 A, 2009. 03. 11, 权利要求 1、
2、8, 说明书实施例 1.

CN 101691404 A, 2010. 04. 07, 说明书实施例
1、4.

CN 101870731 A, 2010. 10. 27, 权利要求 6,

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法

(57) 摘要

本发明公开一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,主要是将待检测的小分子物质首先与抗体/受体发生充分反应,然后再与位于固相上的参与竞争反应的第二分子在短时间内反应,这样能大大提高了免疫分析方法的灵敏度。本发明方法操作简单,成本低,不需要用到昂贵的设备和专业的技术人员,而且灵敏性高,适用于多种免疫分析方法。

1. 一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其特征在于,所述提高竞争免疫分析灵敏性的方法步骤如下:

预反应:将待检测物质与受体/抗体进行预反应;

再反应:将预反应的反应产物与位于固相上的参与竞争反应的第二分子进行反应;

所述再反应过程中将预反应的反应产物分成一份或多份,分别与在同一微孔内的所述第二分子依次进行反应;

所述待检测物质为小分子物质;

所述再反应过程中,所述预反应的反应产物是以流动的方式流过所述固相表面与所述第二分子反应;

所述再反应过程中,每一份预反应的反应产物与所述第二分子的反应时间在5min以内。

2. 根据权利要求1所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其特征在于,每一份所述预反应的反应产物与所述第二分子进行反应后,将反应后的液体去除。

3. 根据权利要求1所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其特征在于,所述预反应过程的反应温度为0°C -65°C,反应时间为30min。

4. 根据权利要求1所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其特征在于,所述第二分子是指参与竞争反应的小分子与载体蛋白形成的偶联物。

一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学检测领域,尤其涉及一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法。

背景技术

[0002] 免疫学检测方法是应用免疫学理论设计的一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及其分泌的细胞因子的实验方法。抗原借助表面的抗原决定簇与抗体分子超变区在空间构型上的互补,发生特异性结合。同一抗原分子可具有多种不同的抗原决定簇,若两种不同的抗原分子具有一个或多个相同的抗原决定簇,则与抗体反应时可出现交叉反应。

[0003] 抗原抗体结合除以空间构型互补外,主要以氢键、静电引力、范德华力和疏水键等分子表面的非共价方式结合,结合后形成的复合物在一定条件下可发生解离,回复抗原抗体的游离状态。解离后的抗原和抗体仍保持原有的性质。抗原抗体复合物解离度在很大程度上取决于特异性抗体超变区与相应抗原决定簇三维空间构型的互补程度,互补程度越高,分子间距越小,作用力越大,两者结合越牢固,不易解离;反之,则容易发生解离。

[0004] 而小分子抗原或半抗原因抗原表位少,不能用夹心法进行测定,只能采用竞争法检测模式。而现有的检测小分子抗原的方法主要有酶联免疫吸附试验、免疫层析试验、仪器分析等方法。酶联免疫吸附试验因其特异、灵敏、检测成本低而得到广泛应用。免疫层析试验虽然简便易用,但因其准确性不高,同样限制了它的应用。仪器分析法准确、可靠,但因需要用到昂贵的设备和专业的技术人员,限制了它的应用,多用于确认检测。

[0005] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0006] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,旨在解决现有免疫分析方法灵敏性偏低、不适于高灵敏检测的问题。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述提高竞争免疫分析灵敏性的方法步骤如下:

[0009] 预反应:将待检测物质与受体/抗体进行预反应;

[0010] 再反应:将预反应的反应产物与位于固相上的参与竞争反应的第二分子进行反应;

[0011] 所述再反应过程中将预反应的反应产物分成一份或多份,分别与所述第二分子进行反应。

[0012] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述再反应过程中,所述预反应的反应产物是以流动的方式流过所述固相表面与所述第二分子反应。

[0013] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述再反应过程中,每一份预反应的反应产物与所述第二分子的反应时间在 20min 以内。

[0014] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述再反应过程中,每一份预反应

的反应产物与所述第二分子的反应时间在 5min 以内。

[0015] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,每一份所述预反应的反应产物与所述第二分子进行反应后,将反应后的液体去除。

[0016] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述预反应过程的反应温度为 0℃ -65℃,反应时间为 0-3 小时。

[0017] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述预反应过程的反应时间为 30min。

[0018] 所述的提高竞争免疫分析灵敏性的方法,其中,所述第二分子是指参与竞争反应的小分子与载体蛋白形成的偶联物。

[0019] 有益效果:本发明从反应方式上着手,提供一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,主要是将待检测的小分子物质首先与抗体/受体发生充分反应,然后再与位于固相上的参与竞争反应的第二分子在短时间内反应,这样能大大提高了免疫分析方法的灵敏度。本发明方法操作简单,成本低,不需要用到昂贵的设备和专业的技术人员,而且灵敏性高,适用于多种免疫分析方法。

具体实施方式

[0020] 本发明提供一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0021] 灵敏性偏低、不适于高灵敏检测是免疫学检测普遍存在的问题,因而人们开发出了多种免疫学检测信号放大方法,如:酶标记、稀土荧光标记、放射物标记等方式提高检测信号。而本发明从反应方式上着手,提供一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法,主要是将待检测的小分子物质首先与抗体/受体发生充分反应,然后再与位于固相上的参与竞争反应的另一种分子在短时间内反应,这样能大大提高了免疫分析方法的灵敏度。

[0022] 具体的,所述提高竞争免疫分析灵敏性的方法步骤如下:

[0023] 预反应:将待检测物质与受体/抗体进行预反应;

[0024] 再反应:将预反应的反应产物与位于固相上的参与竞争反应的第二分子进行反应。

[0025] 其中,所述预反应,是将待检测物质与受体/抗体先进行充分的反应,即当待测物质为抗原时,则与其抗体进行充分反应,当所述待测物质为补体时,则与其受体进行充分反应。

[0026] 所述预反应具体是在 0℃ -65℃ 之间反应 0-3 小时,反应时间优选为 30min。

[0027] 所述再反应,具体是将预反应的反应产物分成 1 份或多份,分别与参与竞争反应的第二分子进行反应。优选地,可以将所述预反应的反应产物平均分成 2~6 份,然后将每一份反应产物分别与位于固相上的所述第二分子进行反应。所述预反应的反应产物优选为以流动的方式流过表面包被有参与竞争的第二分子的固相表面,经过实验证明,所述预反应产物流动的方式流过所述固相表面与所述第二分子进行反应,能提高竞争免疫分析的灵敏性。其中,所述参与竞争反应的第二分子是指参与竞争反应的小分子与载体蛋白形成的偶联物。所述参与竞争反应的小分子具是指与所述受体相对应的补体或与所述受体相对应的

抗原。

[0028] 所述再反应中,将每一份所述预反应的反应产物与所述第二分子的反应时间控制在 20min 以内,优选 5min 以内。本发明的主要改进在于,所述再反应过程中将预反应产物分一份或多份,然后与参与竞争反应的第二分子在短时间内进行反应,经过大量的实验证明,这样能明显提高竞争免疫反应的灵敏性。而每一份所述预反应的反应产物与第二分子进行反应后,都应将反应后的液体去除,然后再取另一份预反应产物与所述第二分子进行反应。这样,能减少剩余的反应液体对下一次反应的影响,提高分析检测的灵敏性。

[0029] 在进行所述再反应步骤以前,所述提高竞争免疫分析灵敏性的方法还包括以下步骤:

[0030] 将所述第二分子转移到固相上。

[0031] 如,用所述参与竞争反应的小分子包被酶标板。进一步的,当所述参与竞争反应的小分子包被酶标板后,可以用封闭液对所述固相进行封闭,这样能有效地避免抗体和非特异性的抗原结合而造成假阳性结果,使检测的效果更加准确。所述封闭液可以是 BSA、脱脂奶粉等。所述封闭的步骤可以为加封闭液 37℃ 孵育 30min。

[0032] 在进行所述再反应步骤以后,所述提高竞争免疫分析灵敏性的方法还包括以下步骤:

[0033] 显色:在所述再反应的反应产物中加入底物显色液;

[0034] 终止反应:可加入硫酸溶液终止反应;

[0035] 检测:可通过酶标仪测定所述产物的 OD 值。

[0036] 所述提高竞争免疫分析灵敏性的方法,适用于酶联免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、放射免疫分析、化学发光免疫分析、磁化学发光免疫分析、蛋白质芯片分析、液相芯片分析,以及其它免疫学分析方法。本发明方法操作简单,成本低,不需要用到昂贵的设备和专业的技术人员,而且灵敏性高,适用于多种免疫分析方法。

[0037] 实施例 1 现有预反应方式是否能够提高灵敏性(以 ELISA 检测环丙沙星为例)

[0038] 用环丙沙星 BSA 偶联物包被酶标板,1 μ g/mL,每孔 100 μ L,4℃ 封闭过夜。第二天用 3% 的脱脂奶粉封闭。用洗涤液(PBST)配制环丙沙星的标准品 0ppb、1ppb、3ppb、9ppb、27ppb、81ppb。

[0039] 实验分为两组:

[0040] 组 1:把 60 μ L 标准品和 60 μ L 稀释好的环丙沙星抗体 37℃ 预孵育 20min;然后取 100 μ L 加到包被有环丙沙星偶联物的酶标板中,37℃ 反应 30min;洗板,加酶标二抗,37℃ 反应 30min,洗板;加显色剂 100 μ L,37℃ 反应 15min;最后加 50 μ L 终止液,用酶标仪测定 OD450。

[0041] 组 2:往包被有环丙沙星偶联物的酶标板中依次加入 50 μ L 标准品、50 μ L 抗体,37℃ 反应 30min,洗板;加酶标二抗,37℃ 反应 30min,洗板;加显色剂 100 μ L,37℃ 反应 15min;最后加 50 μ L 终止液,用酶标仪测定 OD450。

[0042] 检测结果如下表所示。可以看出组 1 与组 2 相比并不能提高检测的灵敏性。

[0043]

环丙沙星浓度 (ppb)	0	1	3	9	27	81
组 1 OD450	2.072	1.975	1.632	1.448	0.924	0.483
组 2 OD450	2.036	1.904	1.643	1.203	0.952	0.523

[0044] 实施例 2 不同再反应时间的影响(以 ELISA 检测环丙沙星为例)

[0045] 用环丙沙星 BSA 偶联物包被酶标板, $1 \mu\text{g/mL}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 4°C 封闭过夜。第二天用 3% 的脱脂奶粉封闭。用洗涤液配制环丙沙星标准品 0ppb、1ppb、5ppb、10ppb。

[0046] 实验分为 5 组, 每组取 $100 \mu\text{L}$ 标准品与 $100 \mu\text{L}$ 环丙沙星抗体, 37°C 于微孔板中预反应 20min, 然后加到环丙沙星酶标板中:

[0047] 组 1、组 2、组 3、组 4 取 $120 \mu\text{L}$ 预反应产物到环丙沙星酶标板中后分别再反应 30min、20min、10min、5min; 洗板; 加酶标二抗, 37°C 反应 30min, 洗板; 加显色剂 $100 \mu\text{L}$, 37°C 反应 15min; 最后加 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 测定 OD450。

[0048] 组 5 取 $20 \mu\text{L}$ 抗体和标准品的预反应液到环丙沙星酶标板中, 反应 1min, 倒去孔中液体, 在吸水纸上拍干, 再加入 $20 \mu\text{L}$ 混合液反应 1min, 共重复 6 次; 洗板; 加酶标二抗, 37°C 反应 30min, 洗板; 加显色剂 $100 \mu\text{L}$, 37°C 反应 15min; 最后加 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 测定 OD450。

[0049] 检测结果如下表所示。从表中可以看出, 抗体和标准品预先预反应后短时间内与酶标板上固相抗原竞争反应, 能明显提高反应的灵敏度, IC_{50} 可以从 10ppb 降为 1ppb。

[0050]

环丙沙星浓度 (ppb)	时间				
	30min	20min	10min	5min	1min, 6 次
0	2.479	2.195	2.188	1.74	1.778
	2.245	1.904	2.037	1.604	1.727
1	2.036	1.884	1.517	1.21	0.863
	1.989	1.874	1.488	1.189	0.813
5	1.501	1.342	1.003	0.706	0.412
	1.499	1.343	0.984	0.664	0.372
10	1.182	1.101	0.749	0.485	0.332
	1.269	1.204	0.894	0.565	0.302

[0051] 实施例 3 不同预反应时间的影响(以 ELISA 检测环丙沙星为例)

[0052] 用环丙沙星 BSA 偶联物包被酶标板, $1 \mu\text{g/mL}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 4°C 封闭过夜。第二天用 3% 的脱脂奶粉封闭。用洗涤液配制环丙沙星标准品 0ppb、1ppb、5ppb、10ppb。

[0053] 实验分为 4 组, 每组取 $100 \mu\text{L}$ 标准品与 $100 \mu\text{L}$ 环丙沙星抗体, 37°C 于微孔板中分别预孵育 5min、10min、15min、20min, 然后取 $20 \mu\text{L}$ 抗体和标准品的混合液到环丙沙星酶标板中, 反应 1min, 倒去孔中液体, 在吸水纸上拍干, 再加入 $20 \mu\text{L}$ 混合液反应 1min, 共重复 6 次; 洗板; 加酶标二抗, 37°C 反应 30min, 洗板; 加显色剂 $100 \mu\text{L}$, 37°C 反应 15min; 最后加 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 测定 OD450。

[0054] 实验结果如下表所示。从表中可以看出预孵育时间超过 5min 对结果影响不大, 考虑到加样时间的差别, 可以提高到 20min。

[0055]

环丙沙星浓度 (ppb)	预孵育时间			
	5min	10min	15min	20min
0	0.812	0.851	0.842	0.831
	0.789	0.863	0.823	0.811
1	0.337	0.385	0.399	0.434
	0.337	0.353	0.401	0.439
5	0.17	0.175	0.193	0.213
	0.169	0.187	0.206	0.22
10	0.133	0.136	0.149	0.178
	0.15	0.152	0.153	0.169

[0056] 实施例 4 ELISA 检测莱克多巴胺

[0057] 制备莱克多巴胺微孔板：往微板中加入莱克多巴胺包被原，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 反应 2h；弃上清；往微孔板中加入封闭液，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 封闭 1h；用洗涤液洗涤 3 次；备用。用洗涤液配制浓度分别为 0ppb、0.05ppb、0.15ppb、0.45ppb、1.35ppb、4.05ppb 的莱克多巴胺标准品。

[0058] 分两组：

[0059] 组 1：将标准品和莱克多巴胺抗体各 60 μ L 分别加入一新的微孔板中，预反应 20min；取 20 μ L 抗体和标准品的混合液到莱克多巴胺微孔板中，反应 1min，倒去孔中液体，在吸水纸上拍干，再加入 20 μ L 混合液反应 1min，共重复 5 次，每孔中所加入的预反应产物共 100 μ L；加入酶标二抗，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 反应 45min；洗板；加显色剂 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 反应 15min；最后加 50 μ L 终止液，测定 OD450。

[0060] 组 2：将标准品和莱克多巴胺抗体各 60 μ L 分别加入一新的微孔板中，预反应 20min；取：100 μ L 抗体和标准品的混合液到莱克多巴胺微孔板中，反应 30min，倒去孔中液体，在吸水纸上拍干；洗涤；加酶标二抗，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 反应 45min，洗板；加显色剂 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 反应 15min；最后加 50 μ L 终止液，测定 OD450。

[0061] 实验结果如下表所示。从表中可以看出，组 1 可显著提高检测方法的灵敏性。

[0062]

莱克多巴胺浓度(ppb)	0	0.05	0.15	0.45	1.35	4.05
组 10D	1.472	1.175	0.803	0.517	0.324	0.183
组 20D	1.636	1.584	1.391	1.003	0.602	0.323

[0063] 实施例 5 在化学发光免疫检测中的应用(以检测氯霉素为例)

[0064] 1) 氯霉素微孔板的制备：按照 100 μ L/孔加入氯霉素-BSA 偶联物到酶标板中，4 $^{\circ}$ C 过夜，洗涤 3 次，每次间隔 3 min，拍干；按照 130 μ L/孔加入 5% 脱脂奶粉，37 $^{\circ}$ C 封闭 1h，拍干；用洗涤液洗涤 3 次，拍干，备用。用洗涤液配制氯霉素标准溶液：0ppb、0.01ppb、0.03ppb、0.09ppb、0.27ppb、0.81ppb。

[0065] 2) 标准品与氯霉素单抗等体积混合，37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min；然后将产物转至氯霉素微孔板中：

[0066] 组 1：按照 20 μ L/孔的量将产物转至酶标板中，37 $^{\circ}$ C 反应 1min，去除孔中液体，重

复本操作 5 次,每孔中所加入的预反应产物共 100 μ L ;

[0067] 组 2 :将反应产物 100 μ L 一次性转入氯霉素微孔板中,37 $^{\circ}$ C 反应 20min ;

[0068] 3)洗涤 3 次 ;加入 HRP 标记二抗,100 μ L/ 孔,37 $^{\circ}$ C,45 min ;洗涤 5 次 ;加入发光底物后用化学发光测定仪测定发光强度。

[0069] 下表为测试所得数据。

氯霉素标准品浓度 (ppb)		0	0.01	0.03	0.09	0.27	0.81
[0070]	组 1	0.99	0.88	0.66	0.49	0.21	0.11
	(B/B0)	0.97	0.89	0.64	0.48	0.23	0.17
	组 2	0.99	0.96	0.88	0.69	0.46	0.28
	(B/B0)	0.98	0.94	0.89	0.69	0.48	0.27

[0071] 由以上数据可知,采用本发明方法检测氯霉素的灵敏度比常规方法检测的灵敏性更高。

[0072] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

专利名称(译)	一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法		
公开(公告)号	CN102721802B	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	CN201210233377.2	申请日	2012-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市易瑞生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市易瑞生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市易瑞生物技术有限公司		
[标]发明人	朱海 李细清 李金峰		
发明人	朱海 李细清 李金峰		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/54393		
代理人(译)	杨宏		
其他公开文献	CN102721802A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种提高竞争免疫分析灵敏性的方法，主要是将待检测的小分子物质首先与抗体/受体发生充分反应，然后再与位于固相上的参与竞争反应的第二分子在短时间内反应，这样能大大提高了免疫分析方法的灵敏度。本发明方法操作简单，成本低，不需要用到昂贵的设备和专业的技术人员，而且灵敏性高，适用于多种免疫分析方法。

环丙沙星浓度 (ppb)	时间				
	30min	20min	10min	5min	1min, 6次
0	2.479	2.195	2.188	1.74	1.778
	2.245	1.904	2.037	1.604	1.727
1	2.036	1.884	1.517	1.21	0.863
	1.989	1.874	1.488	1.189	0.813
5	1.501	1.342	1.003	0.706	0.412
	1.499	1.343	0.984	0.664	0.372
10	1.182	1.101	0.749	0.485	0.332
	1.269	1.204	0.894	0.565	0.302