



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104931685 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201510312077. 7

(22) 申请日 2015. 06. 09

(71) 申请人 天津医科大学

地址 300203 天津市和平区气象台路 22 号

(72) 发明人 李会强 闫娟娟 李韶深 李迺昶

韩志勇 张盈莹

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理有限公司 12211

代理人 刘莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/536(2006. 01)

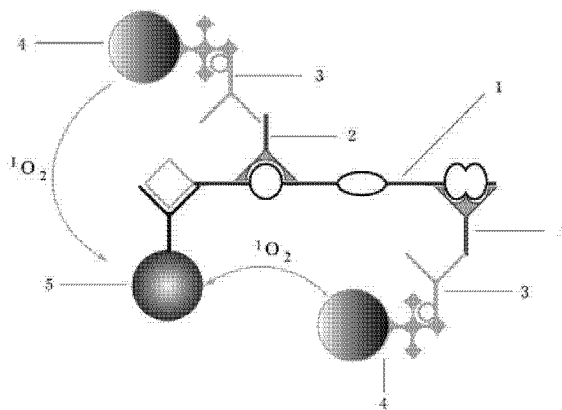
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,基于携带 His 标签的重组蛋白作为已知抗原、抗 His 抗体包被发光微球、生物素标记第二抗体、链霉亲和素标记感光微球共同组成检测试剂。本发明以携带 His 标签的重组蛋白作为已知抗原,最重要特征在此已知抗原置于液相三维空间,与传统技术固相化抗原存在本质区别。而这一改变有效克服传统抗体检测方法因固相化过程所带来的技术问题。此外,利用基于活性氧能量传递的均相发光免疫分析体系,具有更高的分析敏感度和精密度。



1. 一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:包括如下步骤,
 - 1) 获得 His- 重组蛋白;
 - 2) 将待检血清、His- 重组蛋白溶液、His 抗体包被的发光微球溶液充分混匀,并于 37℃ 温浴 30 ~ 45min;
 - 3) 温浴后,经高速离心 10 ~ 15 分钟,弃上清;
 - 4) 加入生物素标记的第二抗体溶液和链霉亲和素包被的感光微球溶液,充分混匀,37℃ 温浴 15 ~ 30min;
 - 5) 用光激发发光检测仪在 615nm 下检测光信号。
2. 根据权利要求 1 所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:所述步骤 1) 中,His- 重组蛋白通过以下步骤获得,根据抗原一级结构合成目的 DNA,并经分子生物学技术将目的基因与携带 His 标签的表达质粒重组,转染合适宿主进行目的蛋白的表达,再经镍亲和层析柱初步纯化获得 His- 重组蛋白,此物质作为已知抗原用于未知检测抗体。
3. 根据权利要求 1 所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:所述步骤 2) 中,三种物质混合均匀后,在 37℃ 下温浴 30 ~ 45min。
4. 根据权利要求 1 或 3 所述的所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:所述步骤 2) 中,待检血清、His- 重组蛋白溶液、His 抗体包被的发光微球溶液的体积比为 1:1:1;且待检血清是用 Tirs-HCl 溶液按照体积比为 1:10 ~ 20 进行稀释处理的,优选的,1:10。
5. 根据权利要求 1 所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:所述步骤 3) 中,高速离心速度为 $10 \times 10^3 \text{r/min}$,且高速离心的时间为 10min。
6. 根据权利要求 1 所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:所述步骤 4) 中,生物素标记的第二抗体溶液、链霉亲和素包被的感光微球溶液与待检血清的体积比为 2:4:1。
7. 根据权利要求 1 或 6 所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,其特征在於:所述步骤 4) 中,所述生物素标记的第二抗体为兔抗人 IgE 或兔抗人 IgG 中的一种。
8. 根据权利要求 1 ~ 7 任一项所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法在特异性 IgE 或自身抗体 IgG 检测中的应用。
9. 根据权利要求 1 ~ 7 任一项所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法在病原体 IgG 或 IgM 检测中的应用。
10. 一种用于如权利要求 1 ~ 7 任一项所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法的试剂盒,其特征在於,包括生物素标记的第二抗体、链霉亲和素包被的感光微球、生物素标记第二抗体、携带 His 标签的重组蛋白。

一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验专业的抗体检测技术领域,主要包括过敏原抗体、病原体抗体和自身抗体,尤其是涉及一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法。

背景技术

[0002] 免疫化学(抗原-抗体反应)技术是检测特异性抗体的重要方法,即采用已知抗原检测未知抗体方式。酶联免疫吸附试验(ELISA)间接法常用于检测上述抗体,也可采用酶联斑点印迹试验(dot-ELISA)以“线性方式”同时包被多种相关抗原,以实现同时检测多种抗体(如抗核抗体谱、HIV 感染确认试验等)。上述两种方法的基本原理如下:用已知抗原包被固相载体(聚苯乙烯微孔板或硝酸纤维素膜);加待检血清温浴,待检抗体与已知抗原结合形成免疫复合物(或待检抗体被固相抗原捕获);再加酶标记抗体并温浴,标记抗体与待检抗体结合,未结合抗体通过“洗涤”去除;最后加底物显色,终止酶促反应后用酶标仪读取吸光度值(A)或直接观察膜表面斑点判定结果。

[0003] 实际应用中发现上述方法存在一些技术方面的缺陷,而这些缺陷影响检测结果准确性或给商业化生产带来某些困难,主要表现在以下方面:

[0004] 其一、固相化问题固相吸附分离是非均相酶免疫分析常用分离技术,其原理是将抗原固相在固相材料表面(聚苯乙烯微孔或硝酸纤维素膜),与待检抗体和酶标抗体形成的抗原-待检抗体-酶标抗体复合物存在于固相材料表面,而游离标记物分布于液相中。倾倒入液相溶液并通过“洗涤”可轻松去除干扰测定的、游离的酶标记抗体。然而,已知抗原与固相材料连接后(包被),分布于固相材料表面的抗原分子,其结构不再具有液相中的天然构象。这种分子构象的变化必将影响已知抗原与待检抗体结合;同时,固相抗原位于固相材料表面,因空间位阻效应会严重影响与待检抗体结合。此外,当包被抗原为分子量较小的多肽分子时,常会因包被过程失去其生物活性,或结合抗体能力显著下降。

[0005] 其二、包被抗原纯度和多种抗原组合的问题固相包被是将抗原包被在固相平面上,微孔板或硝酸纤维素膜的包被面积有限,用于包被的抗原要求较高的纯度,而抗原纯化过程会增加检测试剂盒的生产成本。同时,无论过敏原 sIgE 抗体,还是病原体抗体或自身抗体,一般需要多种蛋白作为已知抗原,而上述固相包被方式并不适合多重抗原同时进行包被。多重抗原包被涉及组分之间比例和空间位阻造成的相互干扰。

[0006] 其三、制备过程和使用过程复杂无论酶联免疫吸附试验还是酶联斑点印迹试验,抗原固相化过程是诊断试剂生产的关键环节,抗原包被-封闭-干燥等过程较复杂,实现标准化需要标准操作程序并严格执行。从用户角度看,上述两种检测试剂的使用也比较复杂,临床标本需要稀释、两次温育和多次洗涤过程需要很长时间,且标记抗体(酶)受多种因素影响等,也不利于操作者的使用。

[0007] 针对上述技术方面的缺陷,本技术发明涉及一种基于携带 His 标签的已知重组抗原,采用活性氧能力传递均相发光免疫分析原理,建立一种新型发光免疫分析体系,用于特异性 IgE、病原体抗体和自身抗体检测。

发明内容

[0008] 有鉴于此,本发明旨在提出一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,采用活性氧能量传递均相发光免疫分析原理,将已知重组抗原置于液相三维空间,与传统技术固相化抗原存在本质区别,本发明建立一种新型发光免疫分析体系,用于特异性 IgE、病原体抗体和自身抗体检测,具有更高的分析敏感度和精密度,且制备工艺简单,操作方便。

[0009] 为达到上述目的,本发明创造的技术方案是这样实现的:

[0010] 一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,包括如下步骤,

[0011] 1) 获得 His- 重组蛋白;

[0012] 2) 将待检血清、His- 重组蛋白溶液、His 抗体包被的发光微球溶液充分混匀,并于 37°C 温浴 30 ~ 45min;

[0013] 3) 温浴后,经高速离心 10 ~ 15 分钟,弃上清;

[0014] 4) 加入生物素标记的第二抗体溶液和链霉亲和素包被的感光微球溶液,充分混匀,37°C 温浴 15 ~ 30min;

[0015] 5) 用光激发发光检测仪在 615nm 下检测光信号。

[0016] 所述 His- 重组蛋白,上游(左端)携带 His 标签,下游是待检抗体所针对的重组蛋白(已知抗原),重组蛋白带有不同抗原表位(如图示含有 3 种抗原表位),此重组蛋白可捕获待检抗体。

[0017] 所述生物素标记的第二抗体,标记有生物素分子,因待检抗体为人免疫球蛋白,可使用兔抗人 IgE(用于检测 IgE 类抗体)或兔抗人 IgG(用于检测 IgG 类抗体)。

[0018] 所述链霉亲和素包被感光微球,感光微球与生物素结合,同时携带感光物质,用激光照射时可产生活性氧分子。

[0019] 所述抗 His 蛋白包被的发光微球,发光微球与 His 蛋白结合,同时接受活性氧能量,可诱导光信号产生。

[0020] 优选的,所述步骤 1) 中,His- 重组蛋白通过以下步骤获得,根据抗原一级结构合成目的 DNA,并经分子生物学技术将目的基因与携带 His 标签的表达质粒重组,转染合适宿主进行目的蛋白的表达,再经镍亲和层析柱初步纯化获得 His- 重组蛋白,此物质作为已知抗原用于检测抗体。

[0021] 优选的,所述步骤 2) 中,三种物质混合均匀后,在 37°C 下温浴 30 ~ 45min。

[0022] 优选的,所述步骤 2) 中,待检血清、His- 重组蛋白混合溶液、His 抗体包被的发光微球的体积比为 1:1:1;且待检血清是用 Tirs-HCl 溶液按照体积比为 1:10 ~ 20 进行稀释处理的,优选的,1:10。

[0023] 所述 His- 重组蛋白混合溶液、His 抗体包被的发光微球溶液的稀释比例根据待测抗体的类型而定。

[0024] 优选的,所述步骤 3) 中,高速离心速度为 10×10^3 r/min,且高速离心的时间为 10min。

[0025] 优选的,所述步骤 4) 中,生物素标记的第二抗体、链霉亲和素包被的感光微球与待检血清的体积比为 2:4:1。

[0026] 优选的,所述步骤 4) 中,所述生物素标记的第二抗体为兔抗人 IgE 或兔抗人 IgG 中的一种。

[0027] 本发明还提供了一种如上所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法在特异性 IgE 检测中的应用。

[0028] 本发明也提供了一种如上所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法在病原体 IgG 或 IgM 检测中的应用。

[0029] 本发明同时提供了一种如上所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法在自身抗体 IgG 检测中的应用。

[0030] 本发明还提供了一种用于如上所述的基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法的试剂盒,其中试剂盒包括生物素标记的第二抗体、链霉亲和素包被的感光微球、生物素标记第二抗体、携带 His 标签的重组蛋白。

[0031] 本发明基于携带 His 标签的重组蛋白作为已知抗原、抗 His 抗体包被发光微球、生物素标记第二抗体(针对待检抗体同种型表位的抗体)、链霉亲和素标记感光微球共同组成检测试剂。

[0032] 在待检抗体存在情况下,待检抗体与重组蛋白形成免疫复合物,此复合物再通过上游的 His 与 His 抗体包被的发光微球结合,通过待检抗体与生物素标记第二抗体结合,并经生物素与链霉亲和素标记的感光微球结合。借助上述反应过程,感光微球和发光微球相互靠近,距离小于 200 纳米,满足活性氧传递光激化学发光条件,用激光照射时体系发光(615nm),证明待检抗体存在,并根据发光强度对待检抗体进行定量分析。如待检标本中不存在待检抗体,不能结合重组已知抗原,也就不能诱导连锁反应,感光微球和发光微球之间距离大于 200nm,不能满足活性氧传递光激化学发光条件,用激光照射时体系不能检测到光信号。

[0033] 相对于现有技术,本发明所述的一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法,具有以下优势:

[0034] 1) 无固相包被过程,液相中抗原能够保持天然构象,不会对已知抗原结合待检抗体的活性产生重大影响;

[0035] 2) 将已知抗原置于液相中,不同于包被后固相表面抗原,液相所提供的是“三维立体空间”,固相提供的是“二维平面空间”。三维立体空间几乎不存“空间位阻”效应,且能有效缩小抗原-抗体达到平衡所需时间。

[0036] 3) 适合多组分作为已知抗原的抗体检测系统。食物过敏原 sIgE 检测,因任何单一食物含有多种致敏蛋白,此类抗体(sIgE)是一种混合物。病原体抗体也是如此。此类抗体检测需要多种相关抗原,不太适合固相包被,而采用本技术发明所设计“液相反应”模式,能够为多重抗原抗体反应提供足够空间。

[0037] 4) 制备工艺简单。本技术发明的检测体系中的抗 His 抗体包被发光微球、生物素标记第二抗体、链霉亲和素标记感光微球均为通用检测试剂,适用于检测指标。重组蛋白的设计也采用相同的 His 标签,为蛋白纯化创造条件。同时,因不需固相包被,系统对重组抗原纯度要求不高,简单纯化即可。

附图说明

[0038] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0039] 图1为本发明所述的一种基于携带 His 标签重组抗原的发光免疫检测方法的原理示意图;

[0040] 附图标记说明:

[0041] 1-His-重组蛋白,2-待检抗体,3-生物素标记的第二抗体,4-链霉亲和素包被感光微球,5-抗 His 蛋白包被的发光微球。

具体实施方式

[0042] 实施例一

[0043] 下面以检测牛奶过敏组分“ β 乳球蛋白”抗体为例,说明本技术发明的具体实施过程。

[0044] 检测试剂:

[0045] (1) 重组 β 乳球蛋白, His- β 乳球蛋白

[0046] (2) 生物素标记的兔抗人 IgE 抗体

[0047] (3) 链霉亲和素包被的感光微球

[0048] (4) 抗 His 蛋白包被的发光微球

[0049] 其中生物素标记的兔抗人 IgE 抗体、链霉亲和素包被的感光微球、抗 His 蛋白包被的发光微球为通用检测试剂。

[0050] 血清样本:

[0051] 疑似牛奶过敏的患者血清

[0052] 检测方法:

[0053] (1) 于检测体系中分别加入 25 μ L His 抗体包被的发光微球溶液(发光微球浓度为 20 微克/毫升), 25 μ L 带 His 标签的重组抗原溶液(蛋白浓度为 10 微克/毫升), 25 μ L 待检血清(Tris-Hcl 溶液 1:10 稀释), 充分混匀;

[0054] (2) 37 $^{\circ}$ C 温浴 30min; 温育后经高速离心 (10×10^3 r/min) 10 分钟, 弃上清;

[0055] (3) 加入 50 μ L 生物素标记的第二抗体溶液, 100 μ l 链霉亲和素包被的感光微球溶液(感光微球的浓度为 20 微克/毫升), 充分混匀;

[0056] (4) 37 $^{\circ}$ C 温浴 30min;

[0057] (5) 用光激发发光检测仪检测光信号(615nm)。

[0058] 结果判读:

[0059]

序号	光信号值	结果
阴性对照	40	
阳性对照	682	
标本 1#	205	阳性

标本 2#	421	中等阳性
-------	-----	------

[0060]

标本 3#	846	强阳性
标本 4#	468	中等阳性
标本 5#	168	阳性
标本 6#	398	中等阳性

[0061] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

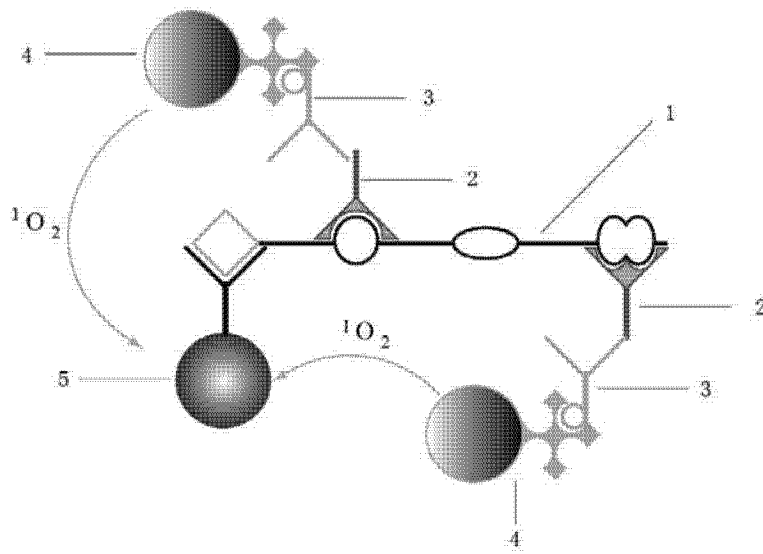


图 1

专利名称(译)	一种基于携带His标签重组抗原的发光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN104931685A	公开(公告)日	2015-09-23
申请号	CN201510312077.7	申请日	2015-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津医科大学		
[标]发明人	李会强 闫娟娟 李韶深 李迺昶 韩志勇 张盈莹		
发明人	李会强 闫娟娟 李韶深 李迺昶 韩志勇 张盈莹		
IPC分类号	G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/536		
代理人(译)	刘莹		
其他公开文献	CN104931685B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于携带His标签重组抗原的发光免疫检测方法，基于携带His标签的重组蛋白作为已知抗原、抗His抗体包被发光微球、生物素标记第二抗体、链霉亲和素标记感光微球共同组成检测试剂。本发明以携带His标签的重组蛋白作为已知抗原，最重要特征是此已知抗原置于液相三维空间，与传统技术固相化抗原存在本质区别。而这一改变有效克服传统抗体检测方法因固相化过程所带来的技术问题。此外，利用基于活性氧能量传递的均相发光免疫分析体系，具有更高的分析敏感度和精密度。

