



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771130 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611013283.9

(22)申请日 2016.11.17

(71)申请人 陕西师范大学

地址 710062 陕西省西安市长安南路199号

(72)发明人 吕家根 赵春欣 段瑞 崔红波
张胜海

(74)专利代理机构 西安永生专利代理有限责任
公司 61201

代理人 高雪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种酶联免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种酶联免疫分析方法,该方法通过葡萄糖氧化酶与单克隆抗体键合形成酶标抗体复合物,被检测抗原与酶标抗体复合物特异性结合后,加入酶反应底物葡萄糖,与葡萄糖氧化酶作用产生初生态活性氧,然后在催化量的辣根过氧化物酶催化作用下,初生态活性氧与显色剂经显色反应放大信号实现对待测抗原的检测。本发明建立的免疫分析方法为夹心法酶联免疫分析法,是一种简便、快速且能够高通量检测的免疫分析方法,且检测结果准确、可靠,在生产成本、运输储存特性、使用安全性和环保性等几个方面均具有显著的意义,具有很高的应用价值。

1. 一种酶联免疫分析方法,其特征在于它由下述步骤组成:

(1) 将待测抗原标准品加入pH值为7.4的PBS缓冲液中,配制1~10000pg/L抗原标准品溶液,将抗原标准品溶液加入到包被抗体的固相载体表面,使抗原与抗体键合,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并拍干;

(2) 将葡萄糖氧化酶标记的单克隆抗体溶解于pH值为7.4的PBS缓冲液后,加入到步骤(1)中键合抗原的固相载体表面,与键合在固相载体表面的抗原反应,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并拍干;

(3) 将葡萄糖水溶液加入到步骤(2)中获得的固相载体表面,30~37℃反应10~20分钟,加入葡萄糖氧化酶显色剂和催化量的辣根过氧化物酶进行显色反应,并测定光密度,绘制光密度随抗原标准品浓度的对数值变化的标准曲线;

(4) 按照上述步骤(1)~(3)方法测试待测抗原样品对应的光密度,结合标准曲线的线性方程即可确定待测抗原样品中抗原的含量。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫分析方法,其特征在于:在步骤(3)中,所述的葡萄糖氧化酶显色剂是4-氨基安替比林和N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺钠盐的显色体系。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫分析方法,其特征在于:所述的洗涤缓冲液是由pH值为7.4的PBS缓冲液和吐温-20组成,其中吐温-20占洗涤缓冲液质量的0.1%。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫分析方法,其特征在于:所述的固相载体为聚苯乙烯酶标板。

一种酶联免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种新型酶联免疫分析方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫分析法(Enzyme-linked immunoassay,简称ELISA),是一种利用抗原抗体之间专一性键结的特性对检体进行检测的方法。ELISA分析法由于其快速、简便的分析特性,广泛用于血清、血浆、尿、便、组织液等样品中各种生化指标、疾病标志物的临床检验。其中,双抗体夹心法是检测抗原最常用的ELISA分析方法,其基本工作原理是:利用连接于固相载体上的抗体和酶标抗体分别与样品中被检测抗原分子上的两个抗原决定簇结合,形成固相抗体-抗原-酶标抗体免疫复合物。由于反应系统中固相抗体和酶标抗体的量相对于待测抗原是过量的,因此复合物的形成量与待测抗原的含量在检测范围内成正比。测定复合物中的酶作用于加入的底物后生成的有色物质量,即可确定待测抗原含量。

[0003] 已有的酶联免疫分析试剂盒,多基于抗原与抗体特异性识别的原理构建。其中,辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)由于其比活性高、稳定、分子量小且纯酶容易制备的特性,常常被用作信号介导物质,来实现对目标对象的信号读出。HRP的催化反应需要底物过氧化氢(H_2O_2)和供氢体(DH_2)。供氢体多为无色的还原型染料,通过反应可生成有色的氧化型染料(D)。HRP催化反应的过程如下:

[0004] $DH_2 + H_2O_2 \rightarrow D + 2H_2O$

[0005] 利用HRP催化过氧化氢(H_2O_2)氧化染料产生显色反应,并采用光度检测仪器得到定性或定量分析结果,来实现对待测物质的检测。因此,所有以HRP作为信号介导的免疫试剂盒,均需要外源性 H_2O_2 作为显色反应试剂配套使用。

[0006] H_2O_2 由于分子结构的低对称性及过氧键的存在,导致其化学稳定性较差,易发生自分解反应或与共存组分发生氧化还原反应。另外, H_2O_2 在高温、光照或与一些不兼容化学物质(如过渡态金属离子、有机可燃物等)作用下,会迅速分解生成水和氧气并放出大量的热,激发其热危险性,进而引发热失控反应,最终导致爆炸事故的发生。因此, H_2O_2 属易燃易爆品,无论在试剂盒的生产、运输、储存等环节,均需要较为苛刻的存放环境和包装材料;由于不得与其他试剂共存,通常要求使用单独的包装; H_2O_2 的自分解,会导致不同批次试剂盒检测结果的可比性变差。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于克服上述采用HRP作为抗体标记物进行酶联免疫分析存在的缺点,提供一种简便、快速且能够高通量检测的酶联免疫分析方法。

[0008] 解决上述技术问题所采用的技术方案由下述步骤组成:

[0009] 1、将待测抗原标准品加入pH值为7.4的PBS缓冲液中,配制1~10000pg/L抗原标准品溶液,将抗原标准品溶液加入到包被抗体的固相载体表面,使抗原与抗体键合,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并拍干。

[0010] 2、将葡萄糖氧化酶标记的单克隆抗体溶解于pH值为7.4的PBS缓冲液后,加入到步骤1中键合抗原的固相载体表面,与键合在固相载体表面的抗原反应,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并拍干。

[0011] 3、将葡萄糖水溶液加入到步骤2中获得的固相载体表面,30~37℃反应10~20分钟,加入葡萄糖氧化酶显色剂和催化量的辣根过氧化物酶进行显色反应,并测定光密度,绘制光密度随抗原标准品浓度的对数值变化的标准曲线。

[0012] 4、按照上述步骤1~3的方法测试待测抗原样品对应的光密度,结合标准曲线的线性方程即可确定待测抗原样品中抗原的含量。

[0013] 上述步骤3中,所述的葡萄糖氧化酶显色剂优选4-氨基安替比林和N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺钠盐的显色体系。

[0014] 上述的洗涤缓冲液是由pH值为7.4的PBS缓冲液和吐温-20组成,其中吐温-20占洗涤缓冲液质量的0.1%。

[0015] 上述的固相载体为聚苯乙烯酶标板。

[0016] 上述葡萄糖氧化酶标记的单克隆抗体用戊二醛二步法制备得到,具体制备方法如下:

[0017] 1、将25mg葡萄糖氧化酶溶于1mL质量分数为1.25%的戊二醛水溶液中,室温静置12小时,所得反应液经Sephadex G-25层析柱,用生理盐水洗脱,流速为1mL/min,收集棕色流出液。若收集得到的棕色流出液体积大于5mL,用聚乙二醇浓缩至5mL,置于25mL烧杯中。

[0018] 2、将12.5mg待标记的单克隆抗体用生理盐水稀释至5mL,搅拌下逐滴加入到步骤1得到的酶溶液中,并加入0.25mL 1mol/L pH=9.5的碳酸缓冲液,继续搅拌3小时,再加入0.25mL 0.2mol/L赖氨酸水溶液,混匀后,室温下放置2小时,然后在搅拌下逐滴加入与反应混合液等体积的饱和硫酸铵,4℃静置1小时,3000rpm离心0.5小时,取下层沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤两次,将沉淀物溶于5mL 0.15mol/L pH=7.4的PBS缓冲液后装入透析袋中,用0.15mol/L pH=7.4的PBS缓冲液透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测)10000rpm离心30min去除沉淀物,上清液即为葡萄糖氧化酶标记的单克隆抗体。

[0019] 本发明的免疫分析方法通过葡萄糖氧化酶(GOD)与单克隆抗体键合形成酶标抗体复合物,被检测抗原与酶标复合物特异性结合后,加入酶反应底物葡萄糖,与GOD作用产生初生态活性氧,然后在催化量的HRP催化作用下,初生态活性氧与显色剂经显色反应放大信号实现对待测抗原的检测。本发明通过被标记GOD和底物葡萄糖作用产生的初生态氧代替外源性H₂O₂,成功地避免了H₂O₂易分解不稳定从而导致检测结果稳定性差的缺点,并且检测结果准确、可靠。

[0020] 本发明建立的免疫分析方法为夹心法酶联免疫分析法,是一种简便、快速且能够高通量检测的免疫分析方法,且在生产成本、运输储存特性、使用安全性和环保性等几个方面均具有显著的意义。本发明方法既可以制作成试剂盒商品化广泛使用,也可用作公司或实验室自测样使用,具有很高的应用价值。

附图说明

[0021] 图1是实施例1中光密度随血管内皮生长因子标准品浓度的对数值变化的标准曲线。

具体实施方式

[0022] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明,但本发明的保护范围不仅限于这些实施例。

[0023] 实施例1

[0024] 测定血管内皮生长因子(VEGF)的含量,具体步骤如下:

[0025] 1、将VEGF标准品加入0.1mol/L pH值为7.4的PBS缓冲液中,分别配制1pg/L、10pg/L、100pg/L、1000pg/L和10000pg/L的VEGF标准品溶液;将包被Anti-VEGF抗体的聚苯乙烯酶标板的各个孔分别用洗涤稀释液(由0.05mol/L pH值为7.4的PBS缓冲液和吐温-20组成,其中吐温-20占洗涤缓冲液质量的0.05%)洗涤后拍干(1次),分别设空白孔(空白孔不加待测样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔,在标准孔中分别加入50μL浓度为1pg/L、10pg/L、100pg/L、1000pg/L和10000pg/L的VEGF标准品溶液,待测样品孔中先加40μL 0.1mol/L pH为7.4的PBS缓冲液,然后再加10μL血清样本(待测样品最终稀释度为5倍),37℃温育1小时,弃去酶标板中液体,拍干,随后用洗涤缓冲液(由pH值为7.4的PBS缓冲液和吐温-20组成,其中吐温-20占洗涤缓冲液质量的0.1%)洗涤酶标板并拍干(3次)。

[0026] 2、将葡萄糖氧化酶标记的单克隆抗体(Recombinant人VEGF 165A protein)加入0.1mol/L pH值为7.4的PBS缓冲液中,配制成0.038U/mL的溶液,在每个标准孔和待测样品孔中各加入50μL该溶液,空白孔除外,37℃温育1小时,弃去酶标板中液体,拍干,随后用洗涤缓冲液(与步骤1相同)洗涤酶标板并拍干(3次)。

[0027] 3、在每个标准孔、待测样品孔、空白孔中均加入50μL 1mol/L的葡萄糖水溶液,30℃反应10分钟,再加入50μL 0.005mol/L 4-氨基安替比林水溶液和50μL 0.004mol/L N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺钠盐水溶液、10μL 40U/mL HRP水溶液,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15分钟;采用酶标仪,以空白孔调零,在555nm波长下分别测量各个孔的光密度,以VEGF标准品浓度的对数值(1gC)为横坐标,光密度为纵坐标,绘制光密度随VEGF标准品浓度的对数值变化的标准曲线(结果见图1),其检出限为 3.24×10^{-4} ng/L。

[0028] 4、根据上述步骤1~3得到的待测样品孔对应的光密度,结合标准曲线的线性方程,计算出血清样本中VEGF的含量为5.30ng/L,再乘以稀释倍数,即为待测样品的实际含量。

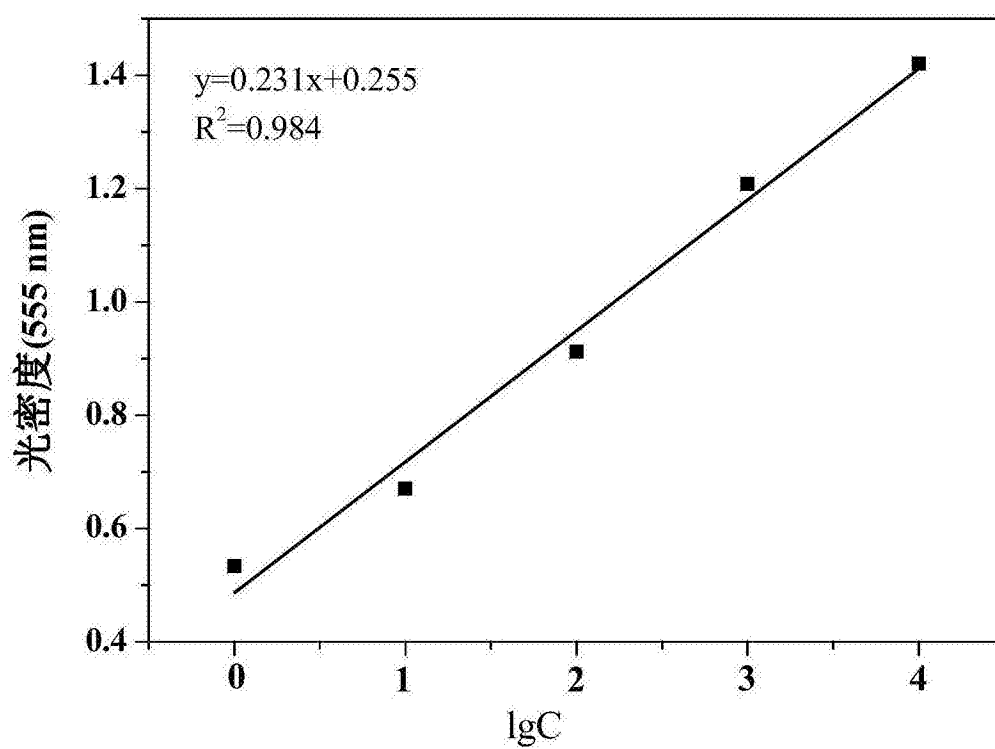


图1

专利名称(译)	一种酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	CN106771130A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611013283.9	申请日	2016-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
[标]发明人	吕家根 赵春欣 段瑞 崔红波 张胜海		
发明人	吕家根 赵春欣 段瑞 崔红波 张胜海		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	高雪霞		
其他公开文献	CN106771130B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种酶联免疫分析方法，该方法通过葡萄糖氧化酶与单克隆抗体键合形成酶标抗体复合物，被检测抗原与酶标抗体复合物特异性结合后，加入酶反应底物葡萄糖，与葡萄糖氧化酶作用产生初生态活性氧，然后在催化量的辣根过氧化物酶催化作用下，初生态活性氧与显色剂经显色反应放大信号实现对待测抗原的检测。本发明建立的免疫分析方法为夹心法酶联免疫分析法，是一种简便、快速且能够高通量检测的免疫分析方法，且检测结果准确、可靠，在生产成本、运输储存特性、使用安全性和环保性等几个方面均具有显著的意义，具有很高的应用价值。

