



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01130226.7

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1155723C

[22] 申请日 2001.11.8 [21] 申请号 01130226.7

[71] 专利权人 郭占军

地址 252000 山东省聊城市文化路 1 号市中
医院

[72] 发明人 郭占军 赵 华 郭爱芹

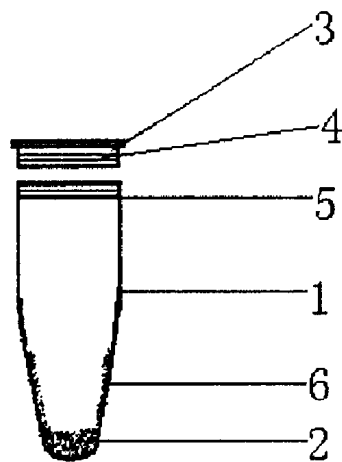
审查员 周 航

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法和试剂盒，其特征是用同一改良扩增管和相应 PCR 扩增试剂，同时连续进行抗原抗体结合反应、靶抗原和病原体靶序列捕获、PCR 扩增靶序列和质粒 DNA、洗涤、特异性标记探针杂交、显色或发光反应步骤，同时连续进行定量 PCR 测定靶序列和免疫 PCR 测定靶抗原，具有简便的操作方法和灵敏、准确的优点。适用于与疾病相关的靶序列和靶抗原的同时定量测定，尤其适用于极微量病原体和标志蛋白的检测。



1、一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法，其特征在于：用同一改良扩增管和相应聚合酶链反应扩增试剂，同时连续进行抗原抗体结合反应、靶抗原和病原体靶序列捕获、聚合酶链反应扩增靶序列和质粒 DNA、洗涤、特异性标记探针杂交、显色或发光反应步骤，同时连续进行定量聚合酶链反应测定靶序列和免疫聚合酶链反应测定靶抗原，该方法包括：

a) 上述改良扩增管是一个高 10-13mm，上口[5]口径为 6-10mm，底部 2-5mm 呈 U 型或 V 型的改良扩增管[1]，其上有一直径 5-11mm 的圆形小盖[3]，小盖[3]上有卡槽或螺纹[4]与该改良扩增管[1]的上口[5]相吻合；在该改良扩增管[1]的底部包被有稳定化的特异性抗体[2]；该特异性抗体[2]是多克隆抗体、单克隆抗体和蛋黄抗体 IgY 中的任一种；

b) 捕获靶抗原和靶序列：向已包被有特异性抗体的改良扩增管中加入待检样品 10-50 μ l，置 37℃作用 10-60 分钟后洗涤；

c) PCR 扩增靶序列和质粒 DNA：向上述改良扩增管中加入裂解液 10-50 μ l 63℃保温 30 分钟，再加入相应聚合酶链反应扩增试剂 20-50 μ l，进行聚合酶链反应扩增，扩增参数为：起始变性 94℃2min；25-35 个聚合酶链反应循环：变性 94℃30s，退火 56℃40s，延长 70℃40s；后置延长 72℃5 分钟；待聚合酶链反应扩增完毕后，洗涤除去多余反应物质；上述聚合酶链反应扩增试剂包括生物素化特异性抗体 10—20 mg/L、游离亲和素 5 mg/L、生物素化靶序列引物 1 和 2 各 50 pmol/L、质粒 DNA 10-50 μ g/L、生物素化质粒 DNA 引物 1 和 2 各 50 pmol/L、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2-0.4 mmol/L 4 种脱氧核糖核苷酸、Taq-DNA 聚合酶 2U、50 mmol/L KCL、10mmol/L PH8.3 Tris-HCL 缓冲液；

d) 特异性标记探针杂交：向改良扩增管中加入荧光素标记的靶序列特异性探针和地高辛标记的质粒 DNA 特异性探针，液相杂交 90℃2-5min、55℃1-10 分钟后，洗涤除去多余的标记探针；

e) 显色或发光定量：向上述改良扩增管中加入碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体和辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体，37℃结合 30 分钟，洗涤后先加入碱性磷酸酶显色剂显色，其颜色深浅与靶序列含量成正比，用酶标仪定量测定之；上述测定完成后，洗涤改良扩增管，加入辣根过氧化物酶显色剂显色，其颜色深浅与靶抗原含量成正比，用酶标仪定量测定之；或洗涤改良扩增管后，向上述改良扩增管中加入荧光显色剂，用荧光测定仪测定所显示的荧光强度，或用发光仪测量发光强度，分别与相应靶序列和靶抗原的含量成正比。

2、根据权利要求 1 所述的定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法，其特征在于：上

述特异性抗体[2]是通过共价键或非共价键的方式与上述改良扩增管[1]相结合;该改良扩增管[1]是由聚乙烯、聚丙烯塑料或其他耐高温材料制作而成,改良扩增管[1]内壁用活化试剂修饰而含有相应的活性基团[6],以利于特异性抗体[2]的共价或非共价结合。

3、根据权利要求1或2所述的定量PCR和免疫PCR通用检测方法,其特征在于:上述特异性抗体采用海藻糖稳定化技术进行稳定化处理;上述特异性抗体为含有海藻糖稳定化的混合物,其与海藻糖的重量比为1:10-30。

4、根据权利要求1所述的定量PCR和免疫PCR通用检测方法,其特征在于:上述聚合酶链反应扩增试剂是生物素化特异性抗体、游离亲和素、生物素化靶序列引物、质粒DNA、生物素化质粒DNA引物及其他所需试剂的混合液;上述聚合酶链反应扩增是对靶序列和质粒DNA进行同时双重扩增;上述标记特异性探针同时分别与靶序列和质粒DNA进行杂交,同时生成生物素化的荧光素或地高辛标记的靶序列和质粒DNA杂交产物。

5、根据权利要求1所述的定量PCR和免疫PCR通用检测方法,其特征在于:生物素化的荧光素标记的靶序列杂交产物是通过:包被特异性抗体—待检抗原—生物素化特异性抗体—亲和素—生物素化的荧光素标记的靶序列杂交产物的复合物形式被改良扩增管捕获;生物素化的地高辛标记的质粒DNA杂交产物是通过:包被特异性抗体—待检抗原—生物素化特异性抗体—亲和素—生物素化的地高辛标记的质粒DNA杂交产物的复合物形式被改良扩增管捕获。

6、根据权利要求1所述的定量PCR和免疫PCR通用检测方法,其特征在于:用两种不同的酶或荧光素定量测定靶序列和靶抗原。

7、一种定量PCR和免疫PCR通用检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括:

a)改良扩增管:该改良扩增管是一个高10-13mm,上口[5]口径为6-10mm,底部2-5mm呈U型或V型的改良扩增管[1],其上有一直径5-11mm的圆形小盖[3],小盖[3]上有卡槽或螺纹[4]与该改良扩增管[1]的上口[5]相吻合;在该改良扩增管[1]的底部包被有稳定化的特异性抗体[2],该特异性抗体[2]是多克隆、单克隆抗体和蛋黄抗体IgY中的任一种或任意组合;该特异性抗体[2]是通过共价键或非共价键的方式与上述改良扩增管[1]相结合;

b)裂解液:是10mmol/L PH8.8 Tris-HCL缓冲液中含有0.4%NP-40;或100mmol/L PH8.8 Tris-HCL缓冲液中含有0.01%Triton X-100、0.05%Tween-20、1mg/L蛋白酶K、50 mmol/L KCL中的任一种;

c)进行定量PCR和免疫PCR所需的扩增试剂:包括生物素化特异性抗体10—20 mg/L、游离亲和素5 mg/L、生物素化靶序列引物1和2各50 pmol/L、质粒DNA 10-50 μ g/L、生物素化质粒DNA引物1和2各50 pmol/L、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.2-0.4 mmol/L 4种脱氧核糖核苷酸、Taq-DNA聚合酶2U、50 mmol/L KCL、10mmol/L PH8.3 Tris-HCL

缓冲液；所述定量 PCR 和免疫 PCR 扩增试剂是上述各组分的混合液；

d) 检测定量 PCR 和免疫 PCR 扩增产物所需的试剂，包括：

1) 变性液：0.4mol/L NaOH 和 25mmol/L EDTA- Na_2 ；

2) 杂交液：10mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 50 mmol/L KCL、1.5 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光素标记的靶序列特异性探针和 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 的地高辛标记的质粒 DNA 特异性探针；

3) 酶或荧光标记抗体包括：碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体和辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体中的任一种组合；

4) 显色液或发光试剂：其中碱性磷酸酶显色剂是以对硝基苯磷酸酯为底物或利用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸和氯化硝基四氮唑蓝显色系统；其中辣根过氧化物酶显色剂是以邻苯二胺或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐为底物；其中荧光试剂是异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明中的任一种或任一组合；其中发光试剂是鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物中的任一种或任一组合。

8、根据权利要求 1 或 7 所述的定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法和试剂盒适用于与疾病相关的靶序列和靶抗原的同时定量测定，尤其适用于极微量病原体和标志蛋白的检测。

定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法和试剂盒

技术领域

本发明属于医学检验领域,特别是涉及一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法和试剂盒。

背景技术

现有定量聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 检测方法是首先将待检样品和 PCR 扩增试剂加入扩增管中进行 PCR 扩增,然后取生物素化的 PCR 产物加入到预先包被有亲和素或链霉亲和素的酶标微孔板中,随后生物素化的 PCR 产物被包被于酶标孔中的亲和素或链霉亲和素所捕获,用 NaOH 将双链 DNA 变性,使之成为单链后加入特异性的荧光素或地高辛标记探针进行杂交反应,然后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗-荧光素标记抗体或抗-地高辛标记抗体,洗板去除未结合的酶标记的抗体后,用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐 (TMB) 显色,通过显色反应颜色的深浅,反映待测样品中 DNA 或 RNA 模板的定量情况 (全文斌,高巍,费然等.核酸扩增产物的量化酶免疫通用型检测方法.中华医学检验杂志,1999,22:83-86)。该方法操作简便、重复性好、特异性强、敏感度高、结果判断客观准确,不足之处是需将 PCR 产物从扩增管中取出并转移到酶标微孔板中,这样不但增加了操作步骤,使 PCR 扩增、探针杂交、酶显色和检测不能在同一管中进行,明显增加了污染的机会,从而降低了本方法的准确性。

免疫-PCR (Immuno-PCR) 是新近建立的一种灵敏、特异的抗原检测系统,它利用抗原-抗体反应的特异性和 PCR 扩增反应的极高灵敏性来检测抗原,尤其适用于极微量抗原的检测。

现有免疫 PCR 检测方法是通过应用一个对 DNA 和抗体具有双重结合活性的连接分子,使作为标记物的 DNA (一般为质粒 DNA) 分子特异性地结合到抗原-抗体复合物上,从而形成一种特异性的抗原-抗体-DNA 复合物,附着的质粒 DNA 分子可用适宜的引物进行 PCR 扩增,特异性 PCR 产物的存在证明 DNA 标记物分子特异性地附着于抗原-抗体复合物上,进而证明有抗原的存在,通过 PCR 扩增标记 DNA 分子,使抗原抗体反应放大,从而判断是否存在特异性抗原。该方法可检测到 1×10^{-9} 微克抗原,其敏感度是现有 ELISA 方法的 1-10 万倍。

目前用作免疫 PCR 中连接分子的通常有两种:链霉抗生物素蛋白-蛋白 A 融合蛋白和抗生物素蛋白 (又称亲和素)。

现有技术中根据葡萄球菌蛋白 A (Staphylococcal protein A, SPA) 可与不同

来源的 IgG 的 Fc 端发生特异性结合而不影响 IgG 分子与抗原结合能力的原理, 构建了通用性 SPA-DNA 探针, 组成 $Ab-(SPA-DNA) \rightarrow PCR$ 通用性模式, 为通用一套系统检测各种抗原提供了条件; 根据生物素和亲和素可以进行特异性结合的原理, 构建了通用性 Bio-DNA 探针, 组成 $Ag-Ab_1-(Ab_2-Bio)-Av-(Bio-DNA) \rightarrow PCR$ 通用性模式, 为通用一套系统检测各种抗体提供了条件。(吴自荣, 陈阜东, 戚蓓静等. 通用型免疫-聚合酶链反应系统的建立及应用. 中华医学检验杂志, 1997, 20:147-149)。

现有技术中用单克隆抗体包被扩增管, 生物素化多抗和游离的亲和素作为连接分子, 生物素化重组质粒作为指示分子, 用特异引物扩增指示分子, 组成了双抗体夹心免疫-PCR 系统, 用于人促甲状腺激素(TSH)的测定, 其检测灵敏度比 ELISA 方法提高了 10^5 倍(杨葵, 周棱, 王衍真. 双抗夹心免疫 PCR 法检测人促甲状腺激素 TSH. 免疫学杂志, 2000, 16:142-145)。

现有免疫 PCR 技术中抗原抗体的结合反应操作与 ELISA 相同, 通常在塑料 ELISA 平板上进行; 而后半程的 PCR 操作则有两种途径: 其一是将平板孔内结合的报告 DNA 模板精确地转移至 PCR 管反应体系中, 再插入普通 PCR 仪中进行扩增反应(Sanna P P, Weiss F, Samson M E, et al. Rapid induction of tumor necrosis factor alpha in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:272-275); 其二是将平板直接置于 PCR 仪中进行扩增反应, 但这需要专用平板 PCR 仪器(Niemeyer CM, Adler M, Blohm D. Fluorometric polymerase chain reaction(PCR) enzyme-Linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates. Anal Biochem, 1997, 246:140-145)。显然前者繁琐, 后者昂贵。采用戊二醛作连接剂, 将蛋白质高效率包被在普通 PCR 管内壁, 使免疫及 PCR 反应用普通 PCR 仪得以在管中连贯地进行, 以普通 PCR 仪进行扩增反应。实验结果表明, 标准曲线的线性关系好, 与 ELISA 方法比较敏感度高出约 10^5 (徐平西, 肖华胜, 鞠躬. 一种简易的免疫 PCR 方法的建立. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26:396-398)。该方法仍需将 PCR 扩增产物转移至酶标微孔板中进行下一步的定量测定。

以上技术方案虽然较好的解决了通过定量 PCR 测定靶核酸序列和通过免疫 PCR 测定微量靶抗原的问题, 但存在需要向微孔板转移扩增产物从而增加操作步骤就不可避免地造成污染的问题。再者上述定量 PCR 只能单独测定相应的靶序列而不能同时测定相应的靶抗原; 上述免疫 PCR 只能单独测定相应的靶抗原而不能同时测定相应的靶序列, 也不能同时进行定量 PCR 和免疫 PCR 从而实现既测定靶序列又能测定靶抗原的目的。

发明内容

本发明的任务就是提供一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法和试剂盒。

本发明的任务是这样完成的：

一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法，其特征在于：用同一改良扩增管和相应聚合酶链反应扩增试剂，同时连续进行抗原抗体结合反应、靶抗原和病原体靶序列捕获、聚合酶链反应扩增靶序列和质粒 DNA、洗涤、特异性标记探针杂交、显色或发光反应步骤，同时连续进行定量聚合酶链反应测定靶序列和免疫聚合酶链反应测定靶抗原，该方法包括：

a) 上述改良扩增管是一个高 10-13mm，上口口径为 6-10mm，底部 2-5mm 呈 U 型或 V 型的改良扩增管，其上有一直径 5-11mm 的圆形小盖，小盖上有卡槽或螺纹[4]与该改良扩增管的上口相吻合；在该改良扩增管的底部包被有稳定化的特异性抗体；该特异性抗体是多克隆抗体、单克隆抗体和蛋黄抗体 IgY 中的任一种；

b) 捕获靶抗原和靶序列：向已包被有特异性抗体的改良扩增管中加入待检样品 10-50 μ l，置 37℃ 作用 10-60 分钟后洗涤；

c) PCR 扩增靶序列和质粒 DNA：向上述改良扩增管中加入裂解液 10-50 μ l 63℃ 保温 30 分钟，再加入相应聚合酶链反应扩增试剂 20-50 μ l，进行聚合酶链反应扩增，扩增参数为：起始变性 94℃ 2min；25-35 个聚合酶链反应循环：变性 94℃ 30s，退火 56℃ 40s，延长 70℃ 40s；后置延长 72℃ 5 分钟；待聚合酶链反应扩增完毕后，洗涤除去多余反应物质；上述聚合酶链反应扩增试剂包括生物素化特异性抗体 10—20 mg/L、游离亲和素 5 mg/L、生物素化靶序列引物 1 和 2 各 50 pmol/L、质粒 DNA 10-50 μ g/L、生物素化质粒 DNA 引物 1 和 2 各 50 pmol/L、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.2-0.4 mmol/L 4 种脱氧核糖核苷酸、Taq-DNA 聚合酶 2U、50 mmol/L KCL、10mmol/L PH8.3 Tris-HCL 缓冲液；

d) 特异性标记探针杂交：向改良扩增管中加入荧光素标记的靶序列特异性探针和地高辛标记的质粒 DNA 特异性探针，液相杂交 90℃ 2-5min、55℃ 1-10 分钟后，洗涤除去多余的标记探针；

e) 显色或发光定量：向上述改良扩增管中加入碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体和辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体，37℃ 结合 30 分钟，洗涤后先加入碱性磷酸酶显色剂显色，其颜色深浅与靶序列含量成正比，用酶标仪定量测定之；上述测定完成后，洗涤改良扩增管，加入辣根过氧化物酶显色剂显色，其颜色深浅与靶抗原含量成正比，用酶标仪定量测定之；或洗涤改良扩增管后，向上述改良扩增管中加入荧光显色剂，用荧光测定仪测定所显示的荧光强度，或用发光仪测量发光强度，分别与相应靶序列和靶抗原的含量成正比。

一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒包括：

a) 改良扩增管：该改良扩增管是一个高 10-13mm，上口口径为 6-10mm，底部 2-5mm 呈 U 型或 V 型的改良扩增管，其上有一直径 5-11mm 的圆形小盖，小盖上有卡槽或螺纹与该改良扩增管的上口相吻合；在该改良扩增管的底部包被有稳定化的特异性抗

体,该特异性抗体是多克隆、单克隆抗体和蛋黄抗体 IgY 中的任一种或任意组合;该特异性抗体是通过共价键或非共价键的方式与上述改良扩增管相结合;

b)裂解液:是 10mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 0.4%NP-40;或 100mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 0.01%Triton X-100、0.05%Tween-20、1mg/L 蛋白酶 K、50 mmol/L KCL 中的任一种;

c)进行定量 PCR 和免疫 PCR 所需的扩增试剂:包括生物素化特异性抗体 10—20 mg/L、游离亲和素 5 mg/L、生物素化靶序列引物 1 和 2 各 50 pmol/L、质粒 DNA 10—50 μ g/L、生物素化质粒 DNA 引物 1 和 2 各 50 pmol/L、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.2—0.4 mmol/L 4 种脱氧核糖核苷酸、Taq-DNA 聚合酶 2U、50 mmol/L KCL、10mmol/L PH8.3 Tris-HCL 缓冲液;所述定量 PCR 和免疫 PCR 扩增试剂是上述各组分的混合液;

d)检测定量 PCR 和免疫 PCR 扩增产物所需的试剂,包括:

1) 变性液: 0.4mol/L NaOH 和 25mmol/L EDTA- Na_2 ;

2) 杂交液: 10mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 50 mmol/L KCL、1.5 μ mol/L 的荧光素标记的靶序列特异性探针和 1.5 μ mol/L 的地高辛标记的质粒 DNA 特异性探针;

3) 酶或荧光标记抗体包括:碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体和辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体中的任一种组合;

4) 显色液或发光试剂:其中碱性磷酸酶显色剂是以对硝基苯磷酸酯为底物或利用 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸和氯化硝基四氮唑蓝显色系统;其中辣根过氧化物酶显色剂是以邻苯二胺或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐为底物;其中荧光试剂是异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明中的任一种或任一组合;其中发光试剂是鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物中的任一种或任一组合。

上述改良扩增管是由聚乙烯、聚丙烯塑料或其他耐高温材料制作而成,其内壁用 1-乙基-3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)把改良扩增管内表面变成含有活泼酯的活性基团,以利于特异性抗体的共价或非共价结合。

本发明采用以上结构和方法后,由于改良扩增管设置了特殊尺寸和采用相应定量 PCR 和免疫 PCR 扩增试剂,可以使改良扩增管既能在 PCR 仪上进行扩增反应又能将其放入微孔板的板孔中进行洗涤处理和标记酶或荧光素的显色反应或荧光或发光检测,能够在改良扩增管中进行上述定量 PCR 和免疫 PCR 的全程反应过程;再者由于在改良扩增管的底部预包被有特异性抗体,通过抗原抗体反应,可有效捕获和富集待检样品中的游离抗原、病原体和相应病原体所携带的核酸物质,从而免去靶核酸的预提取和纯化等操作步骤,同时也避免了其他非检测组分的干扰,而后通过加入生物素化特异性抗体、连接分子(通常是亲和素或链霉亲和素)、相应生物素化靶序列和质粒 DNA 引物及其他相应试剂,继而进行定量 PCR 和免疫 PCR 的扩增反应,同时对靶序列和质

粒 DNA（即标记 DNA）进行双重扩增，再通过洗涤除去多余反应物后，如有待检病原体的存在则相应 PCR 扩增产物就能通过连接分子和生物素化特异性抗体以三明治夹心的方式结合于改良扩增管的底部，然后加入不同标记的靶序列和质粒 DNA 特异性杂交探针进行杂交反应，相应杂交产物通过包被特异性抗体—待检抗原—生物素化特异性抗体—连接分子—生物素化的荧光素或地高辛标记的杂交产物的方式被改良扩增管捕获，继而通过相应标记酶或荧光素的显色反应或荧光或发光强度而达到同时定量测定靶序列和靶抗原的目的，具有简便的操作方法和灵敏、准确的优点，适用于与疾病相关的靶序列和靶抗原的同时定量测定，尤其适用于极微量病原体 and 标志蛋白的检测。

附图说明

附图是本发明的结构和捕获方式示意图。

附图 1 中，1 为改良扩增管、2 为特异性抗体、3 为小盖、4 为卡槽或螺纹、5 为上口、6 为活性基团。

附图 2 为靶序列杂交产物捕获方式示意图，其中 Ab 为特异性抗体、Ag 为待检抗原、Bio 为生物素、Ab-Bio 为生物素化特异性抗体、Av 为亲和素、Bio-DNA₁ 为靶序列扩增产物、FITC 为荧光素、Bio-DNA₁-FITC 为靶序列杂交产物。

附图 3 为质粒 DNA 杂交产物捕获方式示意图，其中 Ab 为特异性抗体、Ag 为待检抗原、Bio 为生物素、Ab-Bio 为生物素化特异性抗体、Av 为亲和素、Bio-DNA₂ 为质粒 DNA 扩增产物、Dig 为地高辛、Bio-DNA₂-Dig 为质粒 DNA 杂交产物。

具体实施方式

下就结合附图对本发明作进一步的详细描述。

一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测方法，其特征在于：用同一改良扩增管和相应 PCR 扩增试剂，同时连续进行抗原抗体结合反应、靶抗原和病原体靶序列捕获、PCR 扩增靶序列和质粒 DNA、洗涤、特异性标记探针杂交、显色或发光反应步骤，同时连续进行定量 PCR 测定靶序列和免疫 PCR 测定靶抗原，该方法包括：

a) 所述改良扩增管是一个高 10-13mm，上口 5 口径为 6-10mm，底部 2-5mm 呈 U 型或 V 型的改良扩增管 1，其上有一直径 5-11mm 的圆形小盖 3，小盖 3 上有卡槽或螺纹 4 与该改良扩增管 1 的上口 5 相吻合。在该改良扩增管 1 的底部包被有稳定化的特异性抗体 2；在改良扩增管底部包被稳定化的特异性多克隆或单克隆抗体或蛋黄抗体 IgY。所述特异性抗体是多克隆、单克隆抗体、蛋黄抗体 IgY 中的任一种或任意组合，尤其是蛋黄抗体 IgY，因其耐热性好，具有更好的稳定性。所述特异性抗体是通过改良扩增管 1 上的活性基团以共价键或非共价键的方式与上述改良扩增管 1 相结合。上述特异性抗体采用海藻糖稳定化技术进行稳定化处理，以使其具有更好的稳定性，其稳定方法是：取 1-10mg 干重的特异性抗体和 30-100mg 海藻糖加 1ml 的蒸馏水溶解即为稳定化液，也可以向含有 1-10mg/ml 特异性抗体的溶液 1ml 中加入 30-100mg 的海

藻糖,使上述特异性抗体成为含有海藻糖稳定化的混合物,其与海藻糖的重量比为1:10-30。其稳定机理是基于海藻糖类类似于水化膜的性质,可使上述特异性抗体的局部区域处于水化状态,从而使上述特异性抗体的生物分子的活性保持稳定,更重要的是可使改良扩增管上的特异性抗体的活性在干燥状态保持稳定。

b)捕获靶抗原和靶序列:向已包被有特异性抗体的改良扩增管中加入待检样品10-50 μ l,置37℃作用10-60分钟后洗涤。如待检样品中有待检病原体存在,则待检病原体就通过所含的靶抗原与改良扩增管中的特异性抗体发生抗原抗体结合反应而被捕获,同时病原体所含的靶序列也跟随病原体一同被捕获。

c)PCR扩增靶序列和质粒DNA:向改良扩增管中加入裂解液10-50 μ l,裂解液是100mmol/L PH8.8 Tris-HCL缓冲液中含有0.01%Triton X-100、0.05%Tween-20、1mg/L蛋白酶K、50 mmol/L KCL。然后63℃保温30-60分钟,再加入相应PCR扩增试剂(该PCR扩增试剂含生物素化特异性抗体10-20 mg/L、游离亲和素5 mg/L、生物素化靶序列引物1和2各50 pmol/L、质粒DNA 10-50 μ g/L、生物素化质粒DNA引物1和2各50 pmol/L及其他所需试剂)20-50 μ l。然后进行PCR扩增,扩增参数为:起始变性94℃2min;25-35个PCR循环:变性94℃30s,退火56℃40s,延长70℃40s;后置延长72℃5分钟。待PCR扩增完毕后,洗涤除去多余反应物质。选择合适的扩增循环数使PCR反应在“平台期效应”出现前即终止,由于PCR所用的靶序列和质粒DNA引物用生物素标记,这样在扩增反应结束后PCR扩增产物带有生物素成分,随后PCR扩增产物与游离亲和素或链霉亲和素和生物素化特异性抗体形成复合物:(Ab-Bio)-Av-(Bio-PCR扩增产物)。上述复合物再通过待检抗原与改良扩增管中的特异性抗体发生抗原抗体结合反应而被结合于改良扩增管上,其结合形式为:改良扩增管-Av-Ag-(Ab-Bio)-Av-(Bio-PCR扩增产物)。上述Bio-PCR扩增产物包括Bio-靶序列扩增产物和Bio-质粒DNA扩增产物。

d)特异性标记探针杂交:向改良扩增管中加入50-100 μ l变性液:0.4mol/L NaOH和25mmol/L EDTA- Na_2 混匀,室温作用5min,然后加入杂交液20-50 μ l,杂交液为10mmol/L PH8.8 Tris-HCL缓冲液中含有50 mmol/L KCL、1.5 μ mol/L的荧光素标记的靶序列特异性探针和1.5 μ mol/L的地高辛标记的质粒DNA特异性探针。然后进行液相杂交反应:90℃2-5min、55℃1-10min,然后洗涤除去多余的标记探针。在上述反应中荧光素标记的靶序列特异性探针与上述Bio-靶序列扩增产物进行特异性杂交,其杂交产物以下列形式结合于改良扩增管上:改良扩增管-Av-Ag-(Ab-Bio)-Av-(Bio-靶序列杂交产物-荧光素);在上述反应中地高辛标记的质粒DNA特异性探针与上述Bio-质粒DNA扩增产物进行特异性杂交,其杂交产物以下列形式结合于改良扩增管上:改良扩增管-Av-Ag-(Ab-Bio)-Av-(Bio-质粒DNA杂交产物-地高辛)。

e)显色或荧光或发光定量:向上述改良扩增管中加入碱性磷酸酶标记的抗荧光

素抗体和辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体, 37℃结合 30 分钟, 洗涤后先加入碱性磷酸酶显色剂显色, 其颜色深浅与靶序列含量成正比, 用酶标仪定量测定之。上述测定完成后, 洗涤改良扩增管, 加入辣根过氧化物酶显色剂显色, 其颜色深浅与靶抗原含量成正比, 用酶标仪定量测定之; 或洗涤改良扩增管后, 向上述改良扩增管中加入两种不同荧光素的显色剂, 用荧光测定仪测定所显示的两种不同波长或不同颜色的荧光强度, 或用光仪测量发光强度, 分别与相应靶序列和靶抗原的含量成正比。

一种定量 PCR 和免疫 PCR 通用检测试剂盒, 其特征在于: 该试剂盒包括:

- a) 上述改良扩增管是一个高 10-13mm, 上口 5 口径为 6-10mm, 底部 2-5mm 呈 U 型或 V 型的改良扩增管 1, 其上有一直径 5-11mm 的圆形小盖 3, 小盖 3 上有卡槽或螺纹 4 与该改良扩增管 1 的上口 5 相吻合; 在该改良扩增管 1 的底部包被有稳定化的特异性抗体 2; 该特异性抗体 [2] 是多克隆、单克隆抗体和蛋黄抗体 IgY 中的任一种或任意组合; 该特异性抗体 2 是通过共价键或非共价键的方式与上述改良扩增管 1 相结合;
- b) 裂解液包括: 10mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 0.4%NP-40; 或 100mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 0.01%Triton X-100、0.05%Tween-20、1mg/L 蛋白酶 K、50 mmol/L KCL 中的任一种;
- c) 进行定量 PCR 和免疫 PCR 所需的扩增试剂包括: 生物素化特异性抗体 10-20 mg/L、游离亲和素 5 mg/L、生物素化靶序列引物 1 和 2 各 50 pmol/L、质粒 DNA 10-50 μg/L、生物素化质粒 DNA 引物 1 和 2 各 50 pmol/L、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2-0.4 mmol/L 4 种脱氧核糖核苷酸、Taq-DNA 聚合酶 2U、50 mmol/L KCL、10mmol/L PH8.3 Tris-HCL 缓冲液;
- d) 检测定量 PCR 和免疫 PCR 扩增产物所需的试剂包括:
 - 1) 变性液: 0.4mol/L NaOH 和 25mmol/L EDTA-Na₂;
 - 2) 杂交液: 10mmol/L PH8.8 Tris-HCL 缓冲液中含有 50 mmol/L KCL、1.5 μmol/L 的荧光素标记的靶序列特异性探针和 1.5 μmol/L 的地高辛标记的质粒 DNA 特异性探针;
 - 3) 酶或荧光标记抗体包括: 碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体和辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体中的任一种组合;
 - 4) 显色液或发光试剂: 其中碱性磷酸酶显色剂是以对硝基苯磷酸酯 (p-NPP) 为底物或利用 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸 (BCIP) 和氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 显色系统; 其中辣根过氧化物酶显色剂是以邻苯二胺 (OPD) 或 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺盐酸盐 (TMB) 为底物; 其中荧光试剂是异硫氰酸荧光素 (FITC)、四乙基罗丹明 (RB200)、四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 中的任一种或任一组合; 其中发光试剂是鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物中的任一种或任一组合。

所述特异性抗体 2 是通过共价键或非共价键的方式与上述改良扩增管相结合。该改良扩增管是由聚乙烯、聚丙烯塑料或其他耐高温材料制作而成，其内壁用 1-乙基-3-(3-二甲氨基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 把改良扩增管 1 内表面变成含有活泼酯的活性基团 6，以利于特异性抗体 2 的共价或非共价结合。

所述定量 PCR 和免疫 PCR 扩增试剂是上述各组分的混合液。

上述显色或荧光或发光的定量检测是利用酶标仪、荧光测定仪、发光测定仪定量测定之。

操作时，取适量的待检样品加入改良扩增管中，37℃保温 30—60 分钟，使待检抗原或病原体与改良扩增管底部预包被的单克隆或多克隆抗体发生特异性抗原抗体反应而被捕获和富集，然后加入所需扩增试剂包括生物素化特异性抗体、游离亲和素或链霉亲和素、生物素化靶序列引物 1 和 2、质粒 DNA、生物素化质粒 DNA 引物 1 和 2 及其它反应试剂进行 PCR 扩增，此时靶序列和标记质粒 DNA 同时被扩增，扩增完毕后洗涤除去多余物质，再加入特异性标记寡核苷酸探针与上述生物素化扩增产物进行核酸杂交，杂交产物通过加入的生物素化单克隆或多克隆抗体、连接分子（通常是亲和素或链霉亲和素）与结合到改良扩增管 1 底部的待检抗原发生特异性抗原抗体反应而被结合到改良扩增管 1 底部，洗涤除去多余物质，加入相应酶或荧光标记物与上述复合物结合，洗涤除去多余酶或荧光标记物后加入相应显色剂显色或发光，将该改良扩增管 1 放入微孔板的板孔中，用酶标仪或荧光仪或发光仪测量显色的深浅或荧光或发光的强度，其显色深浅或荧光或发光强度与待检抗原的含量及待检核酸物质的含量呈正比，从而实现定量 PCR 测靶核酸（靶序列）和免疫 PCR 测靶抗原的目的（上述洗涤步骤均可将该改良扩增管放入微孔板的板孔中，然后在洗板机上完成）。

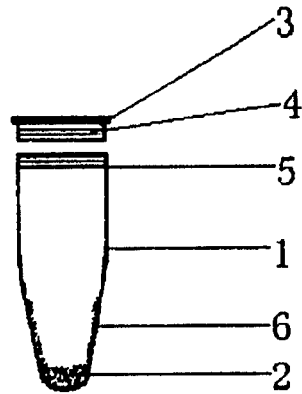


图 1

改良 Eppendorf 管—Ab— Ag— (Ab-Bio) -Av-(Bio-DNA₁—FITC)

图 2

改良 Eppendorf 管—Ab— Ag— (Ab-Bio) -Av-(Bio-DNA₂—Dig)

图 3

专利名称(译)	定量PCR和免疫PCR通用检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1155723C	公开(公告)日	2004-06-30
申请号	CN01130226.7	申请日	2001-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	郭占军		
申请(专利权)人(译)	郭占军		
当前申请(专利权)人(译)	郭占军		
[标]发明人	郭占军 赵华 郭爱芹		
发明人	郭占军 赵华 郭爱芹		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/549 G01N33/68		
其他公开文献	CN1356551A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种定量PCR和免疫PCR通用检测方法和试剂盒，其特征是用同一改良扩增管和相应PCR扩增试剂，同时连续进行抗原抗体结合反应、靶抗原和病原体靶序列捕获、PCR扩增靶序列和质粒DNA、洗涤、特异性标记探针杂交、显色或发光反应步骤，同时连续进行定量PCR测定靶序列和免疫PCR测定靶抗原，具有简便的操作方法和灵敏、准确的优点。适用于与疾病相关的靶序列和靶抗原的同时定量测定，尤其适用于极微量病原体和标志蛋白的检测。

