

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/532 G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01134157.2

[43] 公开日 2003 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 1417586A

[22] 申请日 2001.11.5 [21] 申请号 01134157.2
[71] 申请人 福州市迈新生物技术开发公司
地址 350001 福建省福州市洪山科技园区 2
号楼
[72] 发明人 谢佐福

[74] 专利代理机构 福州展晖专利事务所
代理人 林 瑾

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 一种免疫检测信号放大系统和它的
制备方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及蛋白的制备，尤其是应用偶合剂制作的免疫检测放大系统和它的制备方法及其应用。本发明是一种免疫信号放大系统，它包括葡萄球菌蛋白 A (SPA) 与链霉素抗生物素 (SP) 的复合物，本系统的检测灵敏度更高，可以代替二抗，操作时间缩短，可与许多种属来源的一抗配用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种免疫信号放大系统，其特征在于它包括葡萄球菌素蛋白 A 与链霉菌素抗生物素的复合物。

2、根据权利要求 1 所述的免疫信号放大系统的制备方法，其特征在于：

2.1 制备活化生物素

2.2 制备葡萄球菌素蛋白 A 的生物素化

2.3 制备链霉菌素抗生物素

2.4 对链霉菌素抗生物素进行标记

2.5 将生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 与已标记的链霉菌素抗生物偶联成葡萄球菌素蛋白 A 与链菌素复合物。

3、根据权利要求 2 所述的一种免疫信号放大系统的制备方法，其特征在于生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 与已标记过的链霉素抗生物素偶联的方法为：

3.1 将生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 溶解于双蒸水或 1.5%醋酸溶液中，生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 与液体的比例为 1g: 1—1.8L，

3.2 将标记过的链霉素抗生物素溶解于 0.1%PBS (PH7.5) 或蒸馏水中，它与液体的比例为 10—15g: 1L；

3.3 将上述 6L 经 3.1 制成溶液和 1L 经 3.2 制成溶液振荡混匀，在搅拌中逐滴加入 0.2%戊二醛 1L，搅拌 5—10 分钟，于室温下继续反应 1—2 小时。

4、根据权利要求 2 所述的的免疫信号放大系统的制备方法，其特征在于：葡萄球菌素蛋白 A 与链霉素抗生物素偶联的方法为 MBS 法；

4.1 将 1-3mg 生物素化葡萄球菌素蛋白 A 溶于 0.5mlPBS 中透析，透析液加入 MBS/DMF，每 ml DMF 中含 15mg MBS50—58ml，用 PD-10 层析柱层析；

4.2 将 2—3mg 标记过的链霉素抗生物素溶于 PBS 中，然后与上述 4.1 的葡萄球菌素蛋白 A 溶液混合，再用蒸馏水透析过夜，葡萄球菌素蛋白 A—链霉素抗生物素

复合物置 4℃保存。

5、根据权利要求 2 所述的免疫信号放大系统的制备方法，其特征在于：
葡萄球菌素蛋白 A 与链霉素抗生物素偶联的方法为 EDCI 法，将 7—8mg 生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 溶于 1ml 双蒸水中，加入 EDCI 40mg，用 0.1mol/L HCl 调至 PH4.5，加入双蒸水溶解的 SP3—5mg/0.5ml，4℃透析过夜，冰箱保存。

6、根据权利要求 2 所述的免疫信号放大系统的制备方法，其特征在于：

葡萄球菌素蛋白 A 与链霉素抗生物素偶联的方法为 BDB 法，将生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 3—4mg 溶于 8—10ml PH9.0 硼酸缓冲液中，加入已标记的链霉素抗生物素 1.5—1.8mg，缓慢加入 0.1ml BDB，置 4℃振荡 2 小时，用 0.1mol/L NaOH 调至 PH9.0，倒转试管数次，低温冰箱中保存。

7、根据权利要求 1 所述的免疫放大系统在检测系统中的应用，其特征在于，

7.1 常规制备针对靶抗原的第一抗体（单克隆抗体或抗血清）；

7.2 制备葡萄球菌素蛋白 A—链霉素抗生物素免疫信号放大系统，

7.3 常规制备非免疫动物血清；

7.4 DAB 染色剂（为 HRP 的底物）；

7.5 将一抗和葡萄球菌素蛋白 A—链霉素抗生物素免疫信号放大系统通过对靶组织和非靶组织（对照组织）进行棋盘式测定，找出最大的信号 / 噪音比的显色效果后，组成免疫组织化学葡萄球菌素蛋白 A—链霉素抗生物素检测试剂盒。

一种免疫检测信号放大系统和它的制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及蛋白的制备，尤其是应用偶合剂制作的免疫检测放大系统和它的制备方法及其应用。

背景技术

免疫检测技术是目前医学、生物学等领域最基本也是最常用的检测技术之一，它不仅广泛应用于医学生物学基础研究，也广泛应用于医学临床，甚至环境监测，在疾病诊断、疾病发展的预测、疾病治疗的反应性、病人预后的预测，甚至食品和环境微生物污染的监测中都具有十分重要的应用价值。免疫检测技术包括免疫组织化学技术、酶联免疫吸附技术（ELISA 等）、免疫层析技术、免疫沉淀技术及免疫芯片技术等。不论是通过抗原检测抗体还是通过抗体检测抗原，所有这些技术是建立在抗原抗体反应基础之上的。免疫检测方法不仅特异性高，而且几十年来人们通过不断的探索，发明了一些免疫检测信号放大系统，如除使用能与目的抗原特异结合的第一抗体外，再加上信号放大系统，如加能与第一抗体结合的第二抗体，甚至在加生物素标记第二抗体后再加卵白素或链霉菌素抗生物素（streptavidin，在下文中称为 SP），或在加第二抗体后加过氧化物酶标记的葡萄球菌素蛋白 A（staphylococcal protein A，在下文中称为 SPA），使其免疫反应特异信号多次放大，从而大大提高了检测的灵敏度。目前最常用的免疫信号放大系统是 SP 放大系统（也有人称之为 SLAB 系统），该信号放大系统在免疫组织化学检测中比传统的 ABC 法或 PAP 法等要敏感数倍至十几倍。即使如此，SP 免疫信号放大系统对于非常微量的抗原如病原微生物的检测仍然无能为力。

发明内容

本发明的目的在于提供一种能用于多种免疫检测如免疫组织化学检测、酶联免疫吸附检测、免疫层析检测及免疫芯片等在内的免疫检测信号放大系统和它的制备方法及其应用。

本发明所述的一种免疫信号放大系统，它包括葡萄球菌素蛋白 A (SPA) 与链霉菌素抗生物素 (SP) 的复合物。

它的制备方法为：

1、活化生物素的制备：

● 1.5-2.5mg 生物素加入 30ml-50ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中，再依次加入 0.5--2.5g 琥珀酰亚胺脂和 1-3.0g 双乙基碳化二亚胺，室温下密闭磁力搅拌 20—24 小时，使其析出沉淀物。

● 减压过滤除去沉淀物，并滴加 DMF 洗涤数次，滤液置 4℃ 过夜。

● 减压过滤除去沉淀物，滤液加热至 100℃ 左右，减压抽去 DMF 后得到固体物质。

● 用少量乙醚洗涤数次，进一步除去双环乙基碳化二亚胺和减压除去溶剂 DMF，得到活化生物素纯品。此纯品置 4℃ 干燥保存。

2、葡萄球菌素蛋白 A (SPA) 的生物素化

1ml 的 SPA (0.01—0.03mg/ml)，用 0.1mol/LNaHCO₃ 调到 PH8.5，加入 2—3mg 的活化生物素，室温搅拌 60 分钟，4℃ 过夜，然后用 PBS 缓冲液透析，0.2 μm 滤孔膜除菌。

3、制备链霉菌素抗生物素 (SP)

按常规方法制备。简介如下：Savidinil ATCC27419 菌株培养液 100ml，纱布过滤并离心，上清用 6mol/LNaOH 调到 PH11，将 10ml 亚胺生物素-CL-Sepharose 4B 加入 1000ml 上清中，25℃ 搅拌 1 小时，用砂芯漏斗抽滤，直到 OD_{280nm}=0，将洗后的 4B 珠装柱，用 PH4.0 的 PBS 缓冲液洗下，再于 4℃ 下用

PH7.0 的 PBS 透析。

4、对 SP 进行标记，如用过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（AP）、同位素、荧光素等标记。HRP 标记 SP 方法如下：

2—4 mg HRP 和 4—8 mg SP 溶于 1 ml 的 0.1mol/L PH6.8 的 PBS 中，与 30--60 μ l 的 0.1% 戊二醛水溶液混合，室温搅拌 3 小时后用 P B S 在 4 °C 下透析 48 分钟，4 °C 下离心（300-4000r / 分钟）30 分钟，最后分装保存于 -20°C 之下。

5、将生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 与已标记的链霉素偶联成葡萄球菌素蛋白 A 与链菌素合物。

5.1 SPA-SP 偶联的方法为：

(1)将 SPA 溶解于双蒸水或 1.5%醋酸溶液中，SPA 与液体的比例为 1g: 1—1.8L，

(2)SP 溶解于 0.1%PBS（PH7.5）或蒸馏水中，SP 与液体的比例为 10—15g: 1L；

(3)将上述 6LSPA 溶液与 1L 的 SP 溶液振荡混匀，在搅拌中逐滴加入 0.2%戊二醛 1L，搅拌 5—10 分钟于室温下继续反应 1—2 小时。

5.2 SPA-SP 偶联的方法为 MBS 法：

(1)将 1—3mgSPA 溶于 0.5mlPBS 中，透析，透析液加入 MBS/DMF（每 ml DMF 中含 15mg MBS）50—58ml，用 PD-10 层析柱层析；

(2)将 2—3mg SP 溶于 PBS 中。然后与 SPA 溶液混合，再同蒸馏水透析过液。SPA-SP 连接物置 4°C 保存供二次试验用。

5.3 SPA-SP 偶联的方法为 EDCI 法：

将 7—8mgSPA 溶于 1ml 双蒸水中，加入 EDCI40mg,用 0.1mol/L Hcl 调至 PH4.5，加入双蒸水溶解的 SP3—5mg/0.5ml，4°C 透析过夜，冰箱保存。

5.4 SPA-SP 偶联的方法为 BDB 法：

将 SPA3—4mg 溶于 8—10ml PH9.0 硼酸缓冲液中，加入 SP1.5—1.8mg，缓

慢加入 0.1mlBDB, 置 4℃振荡 2 小时, 用 0.1mol/L NaOH 调至 PH9.0, 倒转试管数次, 低温冰箱中保存。

本发明的原理为:

SPA 蛋白能与人及许多动物的免疫球蛋白 (Ig) 结合, 结合的部位是 Ig 的 FC 段。每个 SPA 分子可结合 2 个 Ig 分子, 还可同时结合标记物如 HRP、AP、荧光素、胶体金等。正因为如此, 检测抗原时, 如在加一抗后加 SPA, 可代替二抗并使检测的敏感性放大数倍 (与二抗相比, SPA 结合一抗的数量加一倍)。SP 蛋白分子, 其上有四个生物素结合位点, 可结合四个生物素分子, 所以采用 SP 可使原有的免疫检测敏感性提高几十倍。SPA 与 SP 联结成 SPA-SP 复合后, 使其将 SPA 和 SP 的优点集于一身; 使其免疫信号的放大倍数大大提高。

本发明的优点在于:

①与 SP 免疫信号放大系统和 SPA 免疫信号放大系统相比, 其检测的灵敏度更高; ②由于 SPA-SP 信号放大系统可以代替二抗, 节省了二抗的费用; ③由于 SPA-SP 信号放大系统可以代替二抗, 所以与现有通用的免疫检测方法相比, 操作时间缩短; ④由于 SPA 不仅能与一抗 (属 Ig) 结合, 而且无种属特异性, 所以可与许多种属来源的一抗 (不论是单克隆抗体还是抗血清) 配用, 而现有的免疫检测系统中的二抗却不能。

具体实施

免疫信号放大系统, 包括葡萄球菌素蛋白 A (SPA) 与链霉菌素抗生物素 (SP) 的复合物。

制备方法:

- 1、制备活化生物素
- 2、制备葡萄球菌素蛋白 A—SPA 的生物素化
- 3、制备链霉菌素抗生物素 SP
- 4、对链霉菌素抗生物素进行标记

5、将生物素化的葡萄球菌素蛋白 A 与已标记过的链霉素偶联成葡萄球菌素蛋白 A 与链霉素复合物。

实施例 1: 1、活化生物素的制备:

● 2.5mg 生物素加入 30ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中, 再依次加入 1.5g 琥珀酰亚胺脂和 2.0g 双乙基碳化二亚胺, 室温下密闭磁力搅拌 20—24 小时, 使其析出沉淀物。

● 减压过滤除去沉淀物, 并滴加 DMF 洗涤数次, 滤液置 4℃ 过夜。

● 减压过滤除去沉淀物, 滤液加热至 100℃ 左右, 减压抽去 DMF 后得到固体物质。

● 用少量乙醚洗涤数次, 进一步除去双环乙基碳化二亚胺和减压除去溶剂 DMF, 得到活化生物素纯品。此纯品置 4℃ 干燥保存。

2、葡萄球菌素蛋白 A (SPA) 的生物素化

1ml 的 SPA (0.02mg/ml), 用 0.1mol/L NaHCO₃ 调到 PH8.5, 加入 2.5mg 的活化生物素, 室温搅拌 60 分钟, 4℃ 过夜, 然后用 PBS 缓冲液透析, 0.2 μm 滤孔膜除菌。

3、制备链霉素抗生物素 (SP)

按常规方法制备。简介如下: Savidinil ATCC27419 菌株培养液 100ml, 纱布过滤并离心, 上清用 6mol/L NaOH 调到 PH11, 将 10ml 亚胺生物素-CL-Sepharose 4B 加入 1000ml 上清中, 25℃ 搅拌 1 小时, 用砂芯漏斗抽滤, 直到 OD_{280nm}=0, 将洗后的 4B 珠装柱, 用 PH4.0 的 PBS 缓冲液洗下, 再于 4℃ 下用 PH7.0 的 PBS 透析。

4、对 SP 进行标记, 如用过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP)、同位素、荧光素等标记。HRP 标记 SP 方法如下:

4mg HRP 和 8mg SP 溶于 1ml 的 0.1mol/L PH6.8 的 PBS 中, 与 50 μl 的 0.1% 戊二醛水溶液混合, 室温搅拌 3 小时后用 PBS 在 4℃ 下透析 48 分钟, 4℃

下离心（300-4000r / 分钟）30 分钟，最后分装保存于-20℃之下。

5、SPA 与 SP 偶联成 SPA-SP 复合物，即 SPA-SP 免疫信号放大系统。

4mg 葡萄球菌素 A 溶解于 6ml 双蒸水或 1.5%醋酸溶液中,12mg 的链霉素抗生物素溶解于 1ml 0.1%PBS(PH7.5)或蒸馏水中。

将上述 SPA 溶液和 SP 溶液振荡混匀。在搅拌中逐滴加入 0.2%戊二醛 1ml。再搅拌 5~10 分钟，于室温下继续反应 1~2 小时。

原理：

戊二醛在这里起偶合作用，它的两个醛基分别与 SPA 和 SP 这两种蛋白质的-NH₂ 结合，起到了一种“桥梁”作用，从而把 SPA 和 SP 联接在一起。

在上述实施例中第 5 点 SPA 与 SP 偶联的方法也可为：

5.1MBS 法；

- 将 1—3mgSPA 溶于 0.5mlPBS 中透析,透析液加入 MBS/DMF (每 ml DMF 中含 15mg MBS) 50—58ml, 用 PD-10 层析柱层析；
- 将 2—3mg SP 溶于 PBS 中。然后与 SPA 溶液混合，再同蒸馏水透析过液。SPA-SP 连接物置 4℃ 保存供二次试验用。

5.2 SPA-SP 偶联成 SPA-SP 复合物的方法也可用 EDCI 法，

将 7—8mgSPA 溶于 1ml 双蒸水中，加入 EDCI40mg,用 0.1mol/L Hcl 调至 PH4.5，加入双蒸水溶解的 SP3—5mg/0.5ml，4℃ 透析过夜，冰箱保存。

5.3 SPA-SP 偶联成 SPA-SP 复合物的方法还可用 BDB 法，

将 SPA3—4mg 溶于 8—10ml PH9.0 硼酸缓冲液中，加入 SP1.5—1.8mg，缓慢加入 0.1mlBDB，置 4℃ 振荡 2 小时，用 0.1mol/L NaOH 调至 PH9.0，倒转度管数次，低温冰箱中保存。

SPA-SP 免疫信号放大系统应用广泛，主要有：

SPA-SP 免疫信号放大系统与第一抗体和显色系统组成 SPA-SP 免疫检测系统

SPA-SP 免疫信号放大系统与不同的第一抗体（能与靶抗原特异性结合的抗

体)和不同的显色系统可组成不同的免疫检测系统,如组成免疫组织化学 SPA-SP 检测系统、酶联吸附 SPA-SP 检测系统、免疫层析 SPA-SP 金标检测系统和蛋白印迹 (western blot) SPA-SP 检测系统的制备及检测等。

(1)、免疫组织化学 SPA-SP 检测系统制备方法:

- 常规制备针对靶抗原的第一抗体 (单克隆抗体或抗血清);
- 制备 SPA-SP 免疫信号放大系统,见上述;
- 常规制备非免疫动物血清;
- DAB 染色剂 (为 HRP 的底物)。

一抗和 SPA-SP 通过对靶组织和非靶组织 (对照组织) 进行棋盘式测定,找出最大的信号 / 噪音比的显色效果后,组成免疫组织化学 SPA-SP 检测试剂盒。免疫组织化学 SPA-SP 检测的使用方法 (以免疫组织化学 SPA-SP 检测系统检测石蜡切片抑癌基因蛋白 P53 表达为例):

- 石蜡切片脱蜡至水,用 PBS 洗 3 次,每次 5 分钟;
- 每张切片加 50 的过氧化物酶阻断剂,室温 (15-28) 孵育 10 分钟, PBS 洗 3 次,每次 5 分钟;
- 每张切片加 50 的非免疫动物血清,室温 (15-28) 孵育 10 分钟;
- 每张切片加 50 抗 P53 的单克隆抗体 (P1801),室温 (15-28) 孵育 30-60 分钟, PBS 洗 3 次,每次 5 分钟;
- 每张切片加 50 SPA-SP 复合物,室温孵育 10 分钟, PBS 洗 3 次,每次 5 分钟;
- 每张切片加 100 新配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3-10 分钟;
- 自来水洗,苏木素复染,中性树胶封片。

(2)、酶联免疫吸附 SPA-SP 检测系统的制备方法:

- 按常规用抗靶抗原的抗体包被 96 孔反应板
- 制备 SPA-SP 免疫信号放大系统

- 制备 SPA-SP 复合物稀释液（先经系列浓度的 SPA-SP 复合物测定相应抗原，找出最佳稀释度）
- 制备显色液
- 购买所测抗原标准品并配成倍比稀释浓度共 5 管
- 将上述各组分组装成一检测试剂盒。

检测操作步骤(以检测 CA72-4)为例:待检标本(如血清、血浆和胸水)以生理盐水作 5 倍稀释备用。根据需要将酶结合物和缓冲液按 1: 10 的比例混合,此为应用液。向反应孔中加入 25 标准或标本;向反应孔中加入 100 应用液,轻轻混匀。室温反应 150 分钟。用生理盐水洗涤 5 次,每次 3 分钟,拍干。加入 100 显色液,室温避光反应 60 分钟。轻轻混匀,酶标仪 690nm 测量吸光度,绘制标准曲线;查标本测定值。

(3)、免疫层析金标 SPA-SP 检测系统的制备及检测:

本系统由包被有胶体金标一抗的玻璃纤维、包被有 SPA-SP-一抗(与胶体金标的一抗都针对同一抗原,但针对的抗原决定簇不同),和阳性对照的二抗、吸水滤纸以及硬质塑料片底板组成,这几种物质按金标试纸常规装配方法装配,胶体金一抗复合物按常规方法制备,其颗粒大小为 20nm,SPA-SP 与一抗偶联:按 SPA-SP:一抗为 1:3 的比例混合,4℃ 孵育过夜,用 PBS 透析,最后将此膜置于 0.02mol/L Tris HCL(PH 7.4,含 1%BSA 的缓冲液)中浸泡 30 分钟,于室温下密封,干燥处保存,检测方法如下:

将试纸条的玻璃纤维端插入待测液体样本中 20 秒钟,取出平放在桌上 5—10 后即可观察到结果。如样本溶液中存在靶抗原,则在包被 SPA-SP-一抗的 NC 膜处即可见到红色线。

(4)、蛋白印迹(western blot) SPA-SP 检测系统的制备及检测:

本系统由第一抗体、SPA-SP 复合物和氯萘酚显色系统组成。

按常规蛋白由聚丙烯凝胶转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上;取下 NC 膜取下,

放入含 8ml 3%牛血清白蛋白(BSA)/TBS 溶液, 如此封闭后在含 1mmol/L NaN₃ 的 BSA/TBS 中保存过夜。用 TBS 溶液洗膜。倒掉 TBS, 加入 8ml 与靶抗原特异性结合的一抗摇动 1 个小时以上, 孵育过夜。加 8ml SPA—SP 复合物 (按 1: 600—1: 5000 稀释) 摇动 1 小时以上。用 TBS 洗膜 30 分钟, 共同 3 次。用氯萘酚溶液显色 (30mg/ml 氯萘酚溶液 1ml+10ml 甲醇+50mlTBS+30 μ l 双蒸水) 5—30 分钟, 双蒸水洗膜, 吸干膜上水分, 摄片。

专利名称(译)	一种免疫检测信号放大系统和它的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN1417586A	公开(公告)日	2003-05-14
申请号	CN01134157.2	申请日	2001-11-05
[标]发明人	谢佐福		
发明人	谢佐福		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/68		
代理人(译)	林瑾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及蛋白的制备，尤其是应用偶合剂制作的免疫检测放大系统和它的制备方法及其应用。本发明是一种免疫信号放大系统，它包括葡萄球菌素蛋白A(SPA)与链霉素抗生物素(SP)的复合物，本系统的检测灵敏度更高，可以代替二抗，操作时间缩短，可与许多种属来源的一抗配用。