



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107884586 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201711039199.9

(22)申请日 2017.10.31

(71)申请人 吴灿军

地址 100085 北京市海淀区清河学府树家
园一期2号楼2单元205

(72)发明人 吴灿军

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

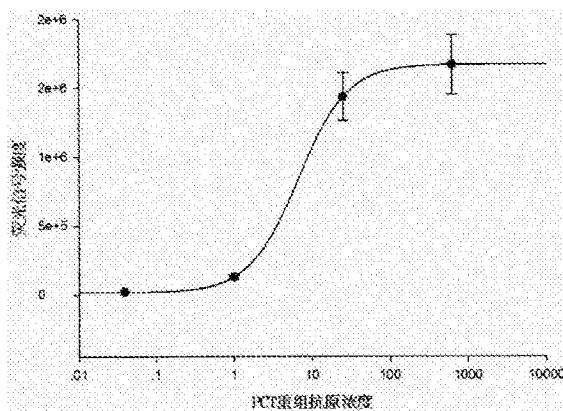
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种磁分离均相免疫检测目标蛋白的方法

(57)摘要

本发明公开了一种磁分离均相免疫检测目标蛋白尤其是降钙素原的方法。鼠抗人PCT抗体标记铕离子荧光微球为检测抗体，另一株鼠抗人PCT抗体标记生物素，偶联表面修饰有链霉亲和素的磁珠作为固相抗体，建立一种通过磁珠分离铕离子荧光微球-检测抗体-降钙素原-固相抗体-生物素-磁珠的均相磁分离免疫检测技术。通过SigmaPlot12.5分析PCT重组抗原的检测灵敏度达到0.04ng/ml。铕离子荧光微球在均相磁分离免疫检测将会有良好的应用前景。



1. 一种磁分离均相免疫检测目标蛋白的方法,包括以下内容:
 - (1) 目标蛋白检测抗体标记铕离子荧光微球:以铕离子荧光微球为标记物,通过EDC/NHS活化铕离子荧光微球,将活化的铕离子荧光微球偶联抗目标蛋白检测抗体;
 - (2) 目标蛋白固相抗体标记生物素:目标蛋白固相抗体上标记生物素;
 - (3) 通过表面修饰有链霉亲和素的磁珠分离游离的荧光微球-检测抗体-目标蛋白-固相抗体-生物素,去除过剩标记抗体和过剩待测物;
 - (4) 均相磁分离免疫检测:检测抗体、抗原、固定抗体在酶标板中进行ELISA。
2. 根据权利要求1所述检测目标蛋白的方法,其中目标蛋白为降钙素原PCT。
3. 根据权利要求2所述检测目标蛋白的方法,其中抗目标蛋白检测抗体为鼠抗人降钙素原检测抗体,目标蛋白固相抗体为鼠抗人降钙素原固相抗体。
4. 根据权利要求3所述检测目标蛋白的方法,其中铕离子微球表面修饰有羧基;(1)中EDC/NHS的最佳使用量是320ug/mg微球,微球直径为200nm左右。
5. 根据权利要求3所述检测目标蛋白的方法,其中(1)中标记铕离子荧光微球标记buffer是50mM PH7.0MES缓冲液。
6. 根据权利要求3所述检测目标蛋白的方法,其中(1)中标记的铕离子荧光微球终浓度为2mg/ml。
7. 根据权利要求3所述检测目标蛋白的方法,其中标记抗体微球固含量2ug/ml、固相抗体浓度0.5ug/ml。
8. 根据权利要求3所述检测目标蛋白的方法,均相磁免疫检测重组抗原的灵敏度达0.04ng/ml。

一种磁分离均相免疫检测目标蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体涉及一种磁分离均相免疫检测目标蛋白的方法。

背景技术

[0002] 免疫分析根据测定过程中是否要将待测物质与反应体系分离可分为非均相免疫分析和均相免疫分析;非均相免疫分析涉及抗原(抗体)的固定和清洗分离步骤,使检测时间增长;均相免疫分析指在测定过程中将待测物与反应体系中的相关试剂液相混合反应后直接测定,整个反应在15-30分钟内完成,较非均相免疫分析显著减少检测时间数小时以上,均相发光免疫分析具有均相、一步、免清洗和高通量检测等一系列优点,使检测精密性更高,因此更受青睐。目前,多种灵敏的检测方法已被应用于均相免疫分析,分为(1)直接化学发光:如Roche电化学发光和吖啶酯化学发光;(2)酶促化学发光(辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)。直接化学发光是指在发光免疫分析过程中不需酶的催化作用,直接参与发光反应,它们在化学结构上有产生发光的特有基团,可直接标记抗原或抗体。但发光试剂通常热稳定性较差,不便于长期保存。酶促化学发光是利用标记酶的催化作用,使发光剂(底物)发光,这一类酶催化后发光的发光剂称为酶促反应发光剂。辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)作为标记酶的均属酶促发光。但较直接化学发光相比,酶促化学发光定量通常线性较差,准确定量较难。

[0003] 以电化学发光为例,阐明均相化学发光的原理和步骤。在电化学发光免疫分析系统中,磁性微粒为固相载体包被抗原(抗体),用三联吡啶钌标记抗原(抗体),在反应体系内待测标本与相应的抗原(抗体)发生免疫反应后,形成磁性微粒包被抗体-待测抗原-三联吡啶钌标记抗体复合物,这时,将上述复合物吸入流动室,同时引入TPA缓冲液。当磁性微粒流经电极表面时,被安装在电极下面的电磁铁吸引住,而未结合的标记抗体和标本被缓冲液冲走。与此同时电极加压,启动电化学发光反应,使三联吡啶钌和TPA在电极表面进行电子转移,产生电化学发光,光的强度与待测抗原浓度成正比。化学发光类检测存在的缺陷是检测试剂热稳定性差。

[0004] 时间分辨荧光免疫测定(TRFIA)是一种非同位素免疫分析技术,它用镧系元素标记抗原或抗体,根据镧系元素螯合物的发光特点,用时间分辨技术测量荧光,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨,可有效地排除非特异荧光的干扰,极大地提高了分析灵敏度。时间分辨荧光法已被用于固相包被的非均相免疫检测技术,用于临床检测具有很好的检测灵敏度、准确性和重复性,且检测试剂稳定性非常强。但存在的缺陷是检测时间过长。目前时间分辨荧光未用于磁分离均相免疫检测。

[0005] 降钙素原(Procalcitonin,PCT)最初是诊断细菌性感染的一种标志物,随后的研究发现降钙素原也可以作为急性胰腺炎、细菌性脑膜炎、肾炎等诸多炎症的标志物,PCT的临床检测也越来越重要,检测敏感性要求也越来越高。现在临床上的半定量检测的免疫层析法(BRAHMS PCT-Q,Henningsdorf,Germany),灵敏度低、检测不准确;酶联免疫检测(ELISA)操作太繁琐;铕离子荧光微球是单个纳米级聚苯乙烯微粒包裹无数经过螯合的铕

离子荧光，是时间分辨荧光技术和纳米技术的结合；而且铕离子荧光微球表面修饰有如羧基、氨基等功能性基团，用以偶联标记蛋白，提高蛋白的标记效率。由于铕离子荧光微球不需要经过解离增强液增强荧光信号，使得铕离子荧光微球能够在多种检测技术中得到很好的应用。但目前尚未有铕离子荧光微球用于磁分离均相免疫检测目标蛋白的报道。

发明内容

[0006] 本发明公开了一种用铕离子荧光微球进行磁分离均相免疫检测目标蛋白的方法。该方法包括以下步骤：首先是目标蛋白检测抗体标记铕离子荧光微球：以铕离子荧光微球为标记物，通过EDC/NHS活化铕离子荧光微球，将活化的铕离子荧光微球偶联抗目标蛋白检测抗体。然后是目标蛋白固相抗体标记生物素。然后是通过表面修饰有链霉亲和素的磁珠分离游离的荧光微球-检测抗体-目标蛋白-固相抗体-生物素，去除过剩标记抗体和过剩待测物。然后进行均相磁分离免疫检测：检测抗体、抗原、固定抗体在酶标板中进行ELISA。

[0007] 其中目标蛋白可以是降钙素原(PCT)，也可以是其他多种蛋白质生物标志物。以检测降钙素原为例，该方法是以铕离子荧光微球为标记物，通过EDC/NHS活化铕离子荧光微球，偶联鼠抗人PCT抗体(检测抗体)；在另一株鼠抗人PCT抗体(固相抗体)标记上生物素。检测抗体、抗原、固定抗体在96孔酶标板中进行ELISA实验，再通过表面修饰有链霉亲和素的磁珠分离游离的荧光微球-检测抗体-PCT-固相抗体-生物素，来去除过剩标记抗体和过剩待测物。本发明中所用的铕离子表面修饰有如羧基、氨基等功能性基团。

[0008] 在本发明的检测目标蛋白的方法中，首先是目标蛋白检测抗体标记铕离子荧光微球。

[0009] 参照bangsLab微球说明书以及铕离子荧光微球检测其它蛋白的层析检测中标记方法标记。具体步骤为：将铕离子荧光微球重悬于MES缓冲液中，加入EDC和NHS。室温下震荡反应离心去除上清后，使用MES(PH6.0)缓冲液置清晰沉淀并复溶于MES缓冲液，加入抗体，室温反应后加入封闭剂，离心获得上清，用去离子水清洗微球。最终将微球复溶于10mM PH7.2 PBS缓冲液中，标记微球终浓度2mg/ml。

[0010] 然后是目标蛋白固相抗体标记生物素。

[0011] 本发明进行了PCT固相抗体标记生物素的制备。生物素标记PCT固相抗体按照EZ-LinkTM NHS-Biotin说明书进行标记，具体步骤为：将PCT固相抗体稀释，水溶EZ-LinkTM NHS-Biotin至10mM/L。PCT固相抗体按照生物素摩尔量是蛋白摩尔量20倍的比例加入EZ-LinkTM NHS-Biotin，冰上反应后，用ZebaTM Spin Desalting Columns (7K MWCO) 离心洗脱过剩活化生物素。得到生物抗体PBS缓冲液复溶(抗体浓度0.5mg/ml)，4℃保存备使用。

[0012] 然后是均相酶免检测。将目标蛋白用TBST缓冲液分别稀释到一定浓度，用TBST缓冲液将标记铕离子荧光微球的检测抗体稀释，TBST稀释生物素标记的固相抗体。在96孔板酶标板中依次加入稀释后的铕离子荧光微球标记的检测抗体，生物素标记固相抗体，再分别加入上述配制浓度目标蛋白，并加入阴性空白对照。37度反应后再加入稀释后的磁微球，震荡后使用。将96孔板静置于Magnetic Separator Stand 96 I上，去除上清反应液，并用TBST缓冲液洗脱，最终用PBS缓冲液重悬后在spectramax i3仪器进行检测荧光信号。

[0013] 通过本发明的方法可以有效提高铕离子荧光微球在磁分离均相免疫检测中的灵敏度。

[0014] 磁性颗粒为固相载体可以应用于均相酶免技术,本发明中以标记铕离子荧光微球的鼠抗PCT抗体为检测抗体,另一株标记磁微球的鼠抗PCT抗体为固相抗体。如图1,固相抗体、检测抗体、抗原在同一反应体系中,在抗原抗体的相互作用下,形成磁微球-固相抗体-抗原-检测抗体-铕离子荧光微球复合物,形成的复合物、固相抗体-磁微球在磁铁作用下固定下来,其他待测抗原和过剩的检测抗体在电极或者其他作用下去除,根据检测的荧光信号得到检测抗原的浓度。

[0015] 在本发明中进行了铕离子荧光微球活化时EDC/NHS最佳使用量的筛选。

[0016] 在实验中发现,铕离子荧光微球活化的效果对最终抗体标记效果影响最大,不同羧基微球活化EDC/NHS使用量的筛选尤其重要。铕离子荧光表面修饰有羧基,如果所有羧基活化则EDC使用的摩尔量和微球表面的核电荷数相同。所以以微球表面核电荷数得到EDC的理论使用量为基础,筛选微球活化的最佳EDC使用量,NHS与EDC使用量相同。结果显示,铕离子荧光微球活化EDC/NHS的最佳使用量是320ug/mg微球。

[0017] 在本发明中还进行了铕离子荧光微球标记buffer的筛选。

[0018] 实验中针对最佳活化状态的羧基微球,不同的标记buffer对不同抗体也有不同的标记效果,使用不同的buffer分别标记抗PCT抗体(检测抗体),用ELISA检测筛选最佳标记buffer,筛选出的鼠抗人PCT抗体的最佳标记buffer是50mM PH7.0MES缓冲液。

[0019] 本发明还进行了磁分离均相免疫检测实验中检测抗体、固相抗体使用量的初步筛选。

[0020] 酶免检测实验中发现铕离子荧光标记的抗体(检测抗体)和生物标记的抗体(固相抗体)使用量对实验最终检测信号具有很大的差异,初步比较标记抗体、固相抗体不同比例的最终检测结果,可以看出标记抗体微球固含量2ug/ml、固相抗体浓度0.5ug/ml的信噪比明显优于标记抗体微球固含量4ug/ml、固相抗体浓度1ug/ml。由此可见标记抗体、固相抗体的使用量对检测信噪比有很大影响,并不是两种抗体的使用量越多检测信噪比越高。

[0021] 本发明还进行了铕离子荧光微球磁分离均相免疫检测技术灵敏度的实验。以检测PCT抗原的灵敏度为例,按照筛选的最佳实验条件进磁分离均相免疫检测实验,配制不同浓度的PCT重组抗原,并进行空白对照检测。用sigmaplot分析该方法对PCT重组抗原的检测灵敏度,最低灵敏度为空白对照+4倍标准差对应的检测浓度。根据标准曲线得到磁分离免疫检测重组抗原的灵敏度可达0.04ng/ml。

[0022] PCT作为临床诊断标志物的应用越来越广泛。虽然有研究表明PCT>0.5ng/ml时患者很大可能为细菌性感染,当PCT>2ng/ml,则患者和脓毒症具有很高相关性极高;但同样有研究指明科技根据不同的cutoff值来指导抗生素的应用(PCT浓度<0.1ng/ml不推荐使用抗生素,PCT浓度>0.25ng/ml建议使用抗生素,而PCT浓度>0.5ng/ml强烈建议使用抗生素);而且PCT作为不同疾病具有不同的检测限。所以临幊上高灵敏度定量的检测PCT的检测方法尤其重要。

[0023] 本发明首次将铕离子荧光微球应用于磁分离均相免疫检测。铕离子荧光微球磁分离均相免疫检测灵敏度可以达到0.04ng/ml。荧光微球表面积大,检测灵敏度显著优于可溶性铕离子荧光,固相包被抗体采用生物素-亲和素系统进行信号放大,也提高了检测敏感度,优于法国梅里埃VIDAS全自动酶联免疫荧光分析系统。而且磁分离均相免疫检测检测技术可以作为自动化检测的一种检测方法,可以在20分钟内完成检测。本发明基于时间分辨

荧光微球的磁分离免疫检测试剂稳定性极高,显著优于吖啶酯等化学发光试剂,对储运条件要求低,因此用于检测目标蛋白具有很高的实用价值,而且铕离子荧光微球磁分离均相免疫检测方法在以后的自动化检测具有良好的市场前景。

附图说明

- [0024] 图1为磁分离均相免疫检测检测原理示意图。
- [0025] 图2筛选铕离子荧光微球活化EDC使用量
- [0026] 图3筛选铕离子荧光微球标记PCT抗体的标记buffer
- [0027] 图4磁分离均相免疫检测检测中检测抗体、固相抗体含量比较
- [0028] 图5铕离子荧光微球标记PCT抗体应用于磁分离均相免疫检测检测技术的标准曲线。

具体实施方式

- [0029] 实施例一PCT检测抗体标记铕离子荧光微球的制备
- [0030] 一材料
- [0031] PCT重组抗原(来源于大肠杆菌),鼠抗人PCT抗体(杭州启泰生物技术有限公司),200nm铕离子荧光微球(BangsLab,USA),3微米磁微球(JSR Life Sciences,Japan),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购买于Sigma-Aldrich(USA),EZ-LinkTM NHS-Biotin(Thermo Fisher Scientific),ZebaTM Spin Desalting Columns,7K MWCO(Thermo Fisher Scientific),超滤管(Millipore),3k15高速离心机(Sigma),超声波破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),Magnetic Separator Stand 96 I(苏州海狸生物医学工程有限公司),分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),Spectramax i3(Molecular Devices)。
- [0032] 二方法
- [0033] 参照bangsLab微球说明书以及铕离子荧光微球检测甲胎蛋白的层析检测中标记方法标记^[9],抗体微球按照质量比为1:25进行标记实验。具体是实验步骤:2.5mg铕离子荧光微球重悬于1mLMES(PH4.5)缓冲液中(荧光微球通过离心沉淀将溶液置换成MES缓冲液),按照每毫克微球分别加入0.8mgEDC和0.8mg的NHS(NHS、EDC用MES缓冲液稀释至10mg/ml)。室温下震荡反应30min,14000r/min离心去除上清,使用MES(PH6.0)缓冲液置清晰沉淀3次并最终复溶于1mIMES(PH6.0)缓冲液后均分在5个EP管中。按量加入抗体,室温反应2h,分别加入5uI封闭剂(10%BSA,MES,PH6.0)。室温反应30min后14000r/min离心获得上清,用去离子水清洗微球。最终将微球复溶于含1%BSA的10mM PH7.2 PBS缓冲液中。标记微球终浓度2mg/ml。
- [0034] 实施例二PCT固相抗体标记生物素的制备
- [0035] 一材料:同上
- [0036] 二方法:
- [0037] 生物素标记PCT固相抗体按照EZ-LinkTM NHS-Biotin说明书进行标记,具体实验步骤:0.1mM PH7.2将PCT固相抗体稀释至2mg/ml,水溶EZ-LinkTMNHS-Biotin至10mM/L。1mIPCT固相抗体按照生物素摩尔量是蛋白摩尔量20倍的比例加入EZ-LinkTM NHS-Biotin,冰上反

应2h,用Zeba™ Spin Desalting Columns (7K MWCO) 离心洗脱反应混合液中过剩的活化生物素。得到生物抗体10mM PH7.2PBS缓冲液复溶(抗体浓度0.5mg/ml),4℃保存备使用。Zeba™ Spin Desalting Columns (7K MWCO) 按照使用说明书操作。

[0038] 实施例三均相酶免检测

[0039] 一、材料:同上

[0040] 二、方法:

[0041] 将PCT重组抗原用TBST缓冲液分别稀释到一定浓度,用TBST缓冲液将标记铕离子荧光微球的检测抗体稀释到微球含量为2 μ g/ml,TBST稀释生物素标记的固相抗体至0.5 μ g/ml(生物素忽略不计),TBST缓冲液将磁微球稀释到微球含量20 μ g/ml。在96孔板酶标板中依次加入25 μ l稀释后的铕离子荧光微球标记的检测抗体(微球含量4 μ g/ml),25 μ l生物素标记固相抗体(抗体浓度1 μ g/ml),再分别加入上述配制浓度PCT重组抗原50 μ l,并加入阴性空白对照。每个浓度以及空白对照进行3个复孔实验,37度反应30min。再加入稀释后的磁微球100 μ l,震荡数次后使用。将96孔板静置于Magnetic Separator Stand 96 I上1-2min。用移液器去除上清反应液,并用TBST缓冲液洗脱3次。最终用100 μ l 10mM PH7.2 PBS缓冲液重悬后在spectramax i3仪器进行检测荧光信号。

[0042] 实施例三铕离子荧光微球活化时EDC/NHS最佳使用量的筛选

[0043] 一、材料:同上

[0044] 二、方法:

[0045] 在实验中发现铕离子荧光微球活化的效果对最终抗体标记效果影响最大,不同羧基微球活化EDC/NHS使用量的筛选尤其重要。铕离子荧光表面修饰有羧基,如果所有羧基活化则EDC使用的摩尔量和微球表面的核电荷数相同。所以以微球表面核电荷数得到EDC的理论使用量为基础,筛选微球活化的最佳EDC使用量,NHS与EDC使用量相同。1mg Bangs Lab羧基微球上羧基全部活化的EDC使用量为240 μ gEDC。按照每毫克微球分别加入80 μ g,160 μ g,240 μ g,320 μ g,400 μ gEDC,450 μ gEDC的比例加入EDC,同时加入等量的NHS进行活化。然后分别标记上鼠抗人PCT抗体(标记抗体),用ELISA方法检测最终的标记效果。

[0046] ELISA检测具体操作:

[0047] 1.抗体包被:将0.05M PH9.6 CB缓冲液将PCT重组抗原按每孔100ng蛋白包被于96孔板,4度包被过夜后甩干。用10mM PBS (PH7.2) 缓冲液震荡洗涤三次。

[0048] 2.封闭:包被完后加入200 μ l 5%BSA的10mM PBS (PH7.2) 缓冲液进行封闭,常温封闭2h后甩干,用10mM PBS (PH7.2) 缓冲液洗涤三次。

[0049] 3.加入标记抗体:10mM PH7.2 PBS缓冲液将不同活化条件下标记的检测抗体(微球含量2mg/ml)按10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、400倍稀释液。然后分别加入包被有PCT重组抗原的96孔酶标板上,并加入两个空白对照。所有浓度和空白对照进行复孔实验。37度震荡反应2h后甩干,并用10mM PBS (PH7.2) 缓冲液震荡洗涤三次。用100 μ l 10mM PBS (PH7.2) 缓冲液重悬后在spectramax i3仪器检测荧光信号。

[0050] 三、结果:

[0051] 用不同EDC量活化的微球标记PCT检测抗体,然后与包被PCT重组抗原的96孔板进行ELISA检测,实验结果如图2。从图中我们可以看出不同稀释浓度的抗体标记微球实验中,几乎都是EDC/NHS使用量为320 μ g/mg微球时的信噪比最高。由此可见铕离子荧光微球活化

EDC/NHS的最佳使用量是320ug/mg微球。

[0052] 实施例四铕离子荧光微球标记buffer的筛选

[0053] 一、材料：同上

[0054] 二、方法：

[0055] 实验中针对最佳活化状态的羧基微球，不同的标记buffer对不同抗体也有不同的标记效果，使用50mM PH7.0MES、10mM PH7.2PBS和50mM PH8.0BBS（硼酸缓冲液）分别标记抗PCT抗体（检测抗体）。不同条件标记的抗PCT抗体用ELISA检测筛选最佳标记buffer。ELISA筛选实验同1.5.3.三、结果：

[0056] 针对最佳活化状态下的铕离子荧光微球，标记buffer对不同的标记抗体影响不一样，由图3展示了在3种标记buffer标记鼠抗人PCT抗体在ELIA中的检测信号。从图中可以看出鼠抗人PCT抗体的最佳标记buffer是50mM PH7.0MES缓冲液。

[0057] 实施例五磁分离均相免疫检测实验中检测抗体、固相抗体使用量的筛选一、材料：同上

[0058] 二、方法：

[0059] 酶免检测实验中发现铕离子荧光标记的抗体（检测抗体）和生物标记的抗体（固相抗体）使用量对实验最终检测信号具有很大的差异，初步比较标记抗体、固相抗体不同比例的最终检测结果标记抗体微球固含量4ug/ml、固相抗体浓度1ug/ml与标记抗体微球固含量2ug/ml、固相抗体浓度0.5ug/ml，分别进行酶免检测实验，其他实验条件相同，酶免实验操作步骤按1.4进行。检测PCT重组抗原浓度为625ng/ml, 25ng/ml, 1ng/ml, 0.04ng/ml。比较两个条件间各浓度PCT检测信号与空白检测的信号比。

[0060] 三、结果：

[0061] 通过检测抗体和固相抗体不同使用量的磁分离免疫实验，探索检测抗体和固相抗体实验结果的影响。图4是两种抗体不同使用量是最终的信噪比。可以看出在不同浓度抗原的信噪比显示，标记抗体微球固含量2ug/ml、固相抗体浓度0.5ug/ml的信噪比明显优于标记抗体微球固含量4ug/ml、固相抗体浓度1ug/ml。由此可见标记抗体、固相抗体的使用量对检测信噪比有很大影响。并不是两种抗体的使用量越多检测信噪比越高。

[0062] 实施例六铕离子荧光微球磁分离均相免疫检测技术PCT抗原的检测灵敏度测定

[0063] 一、材料：同上。

[0064] 二、方法：

[0065] 按照筛选的最佳实验条件进磁分离均相免疫检测实验，配制PCT重组抗原浓度分别为625ng/ml, 25ng/ml, 1ng/ml, 0.04ng/ml，并进行空白对照检测。每个浓度以及空白对照进行5组重复实验。最终用sigmaplot分析该方法对PCT重组抗原的检测灵敏度。最低灵敏度为空白对照+4倍标准差对应的检测浓度。三、结果：

[0066] 铕离子荧光微球标记PCT抗体应用于磁分离均相免疫检测检测技术，最终的标准曲线如图5。使用sigmaplot分析匹配标曲函数为四参数分析函数，四参数方程为 $y = 1.38 \times 10^{-5} + (5.02 \times 10^{-6} - 1.38 \times 10^{-5}) / (1 + (X / 92.40)^{0.4222})$ ($R = 0.99$)。根据标准曲线得到磁分离免疫检测重组抗原的灵敏度可达0.04ng/ml。

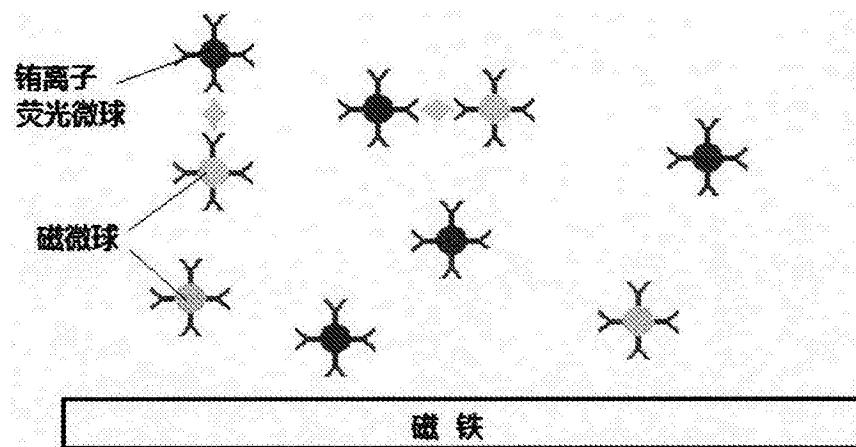


图1

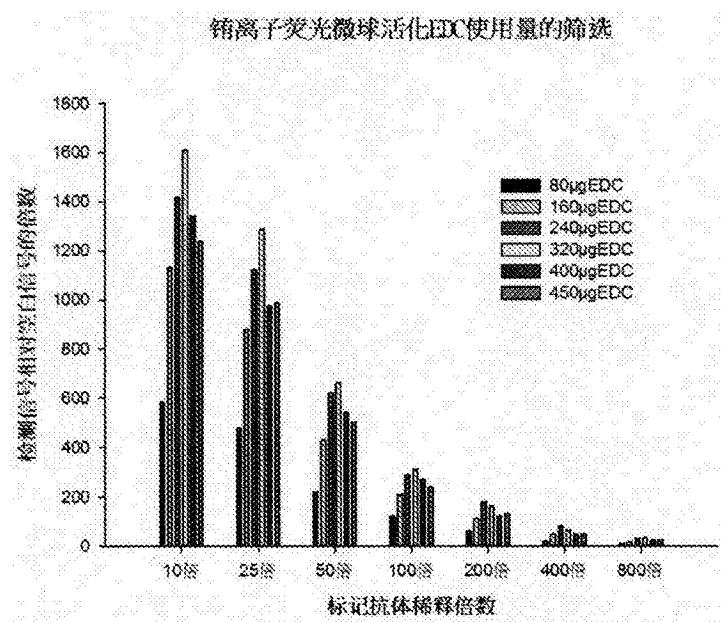


图2

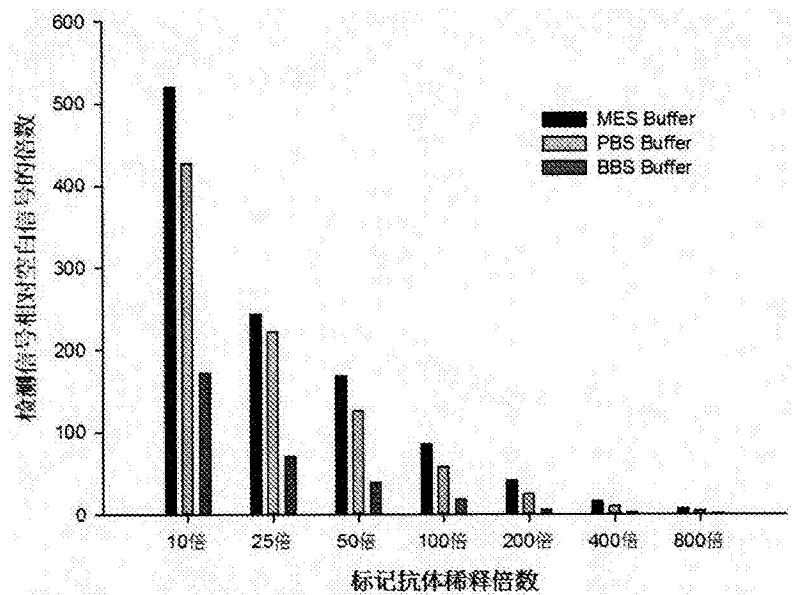


图3

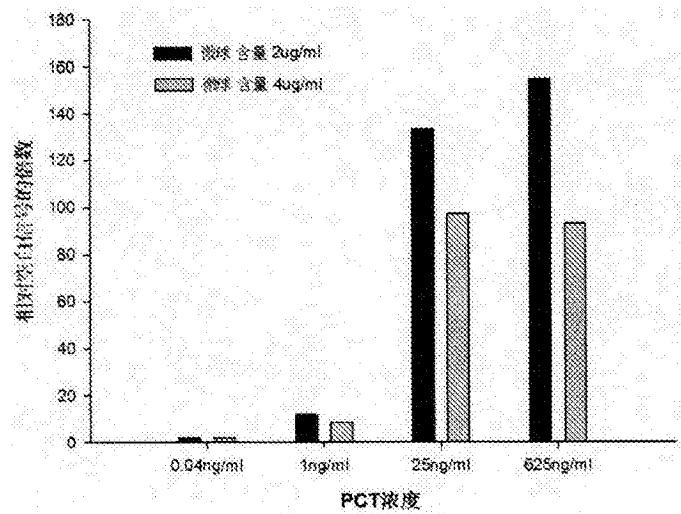


图4

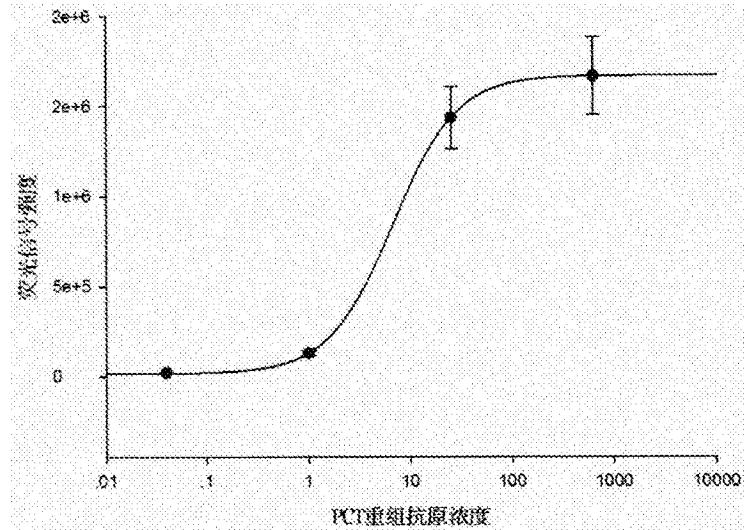


图5

专利名称(译)	一种磁分离均相免疫检测目标蛋白的方法		
公开(公告)号	CN107884586A	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN201711039199.9	申请日	2017-10-31
[标]发明人	吴灿军		
发明人	吴灿军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种磁分离均相免疫检测目标蛋白尤其是降钙素原的方法。鼠抗人PCT抗体标记铕离子荧光微球为检测抗体，另一株鼠抗人PCT抗体标记生物素，偶联表面修饰有链霉亲和素的磁珠作为固相抗体，建立一种通过磁珠分离铕离子荧光微球-检测抗体-降钙素原-固相抗体-生物素-磁珠的均相磁分离免疫检测技术。通过SigmaPlot12.5分析PCT重组抗原的检测灵敏度达到0.04ng/ml。铕离子荧光微球在均相磁分离免疫检测将会有良好的应用前景。

