



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106980016 A

(43)申请公布日 2017.07.25

(21)申请号 201710196765.0

(22)申请日 2017.03.29

(66)本国优先权数据

201611060049.1 2016.11.28 CN

(71)申请人 江西科技师范大学

地址 330000 江西省南昌市红谷滩新区红  
角洲学府大道589号

(72)发明人 刘仁荣

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/33(2006.01)

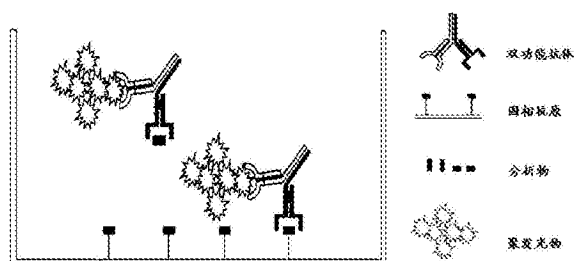
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种竞争型化学发光标记免疫分析方法

(57)摘要

本发明提供了一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,该技术方案以抗待测抗原/抗吡啶酯的双特异性抗体替代了仅与待测抗原具有抗原抗体反应活性的常规抗体,由于该双特异性抗体与待测抗原、吡啶酯均具有抗原抗体反应活性,因此可通过抗原抗体反应将吡啶酯与抗体结合,避免了化学偶联的方法仅能在抗体上偶联低剂量吡啶酯的技术问题,再加之本发明所选用的双特异性抗体对吡啶酯具有较高的亲和力,从而进一步提升了化学发光剂的标记水平。在此基础上,本发明改进了化学发光剂的结构,以多聚体的形式替代单分子吡啶酯,所得的多聚吡啶酯中单体数量大于20,提高了抗体上结合的吡啶酯数量,从而提高了发光强度,进而提升了CLIA方法的灵敏性。



1. 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

- 1) 包被抗原;
- 2) 加入标记有化学发光剂的抗体和待测样品,混匀;
- 3) 洗涤后加入发光启动试剂,检测发光强度;

其特征在于:所述化学发光剂是多聚吡啶酯;所述抗体是同时与多聚吡啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述多聚吡啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吡啶酯为单体的多聚体。

3. 根据权利要求1所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述多聚吡啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与吡啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚吡啶酯。

4. 根据权利要求2或3所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述吡啶酯选自吡啶酯AE-NHS,吡啶酯DMAE-NHS,吡啶酯NSP-DMAE-NHS或吡啶磺酰胺内盐NSP-SA-NHS。

5. 根据权利要求2或3所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述多聚吡啶酯分子中,吡啶酯单体的数量大于20。

6. 根据权利要求1所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述抗体是通过以下方法制备的:

A) 取吡啶酯与载体蛋白偶联,得到吡啶酯人工抗原,利用所述吡啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A)所得的分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗吡啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

C) 培养步骤B)所得的四源杂交瘤细胞,收集所述双特异性抗体。

7. 根据权利要求6所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于步骤A)中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吡啶酯单克隆抗体的解离常数小于 $2 \times 10^{-8}$ 。

8. 根据权利要求6所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于步骤C)完成后继续执行步骤D):分别制备所述抗原偶联琼脂糖亲和柱和吡啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用所述抗原\吡啶酯双亲和柱纯化步骤C)所得的双特异性抗体。

9. 根据权利要求1所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述分析方法的分析对象选自以下成分的其中一种:苏丹红,胭脂红,孔雀石绿,黄曲霉毒素B1,黄曲霉毒素B2,黄曲霉毒素M1,黄曲霉毒素M2,黄曲霉毒素G1,黄曲霉毒素G2,伏马毒素,呕吐毒素,赭曲霉毒素,玉米赤霉烯酮,青霉素,头孢类抗生素,喹诺酮类抗生素,硝基咪唑类抗生素。

10. 根据权利要求1所述的一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于该方法的分析对象是苏丹红I,该方法具体包括以下操作:苏丹红I人工抗原4℃包被过夜,3%脱脂

牛奶封闭,而后分别加入50 $\mu$ L待测样品、50 $\mu$ L抗苏丹红I\抗吡啶酯双特异性抗体、50 $\mu$ L多聚吡啶酯,混匀后于37 $^{\circ}$ C保持1h,利用PBST溶液洗涤4次,而后以100 $\mu$ L/孔的量加入NaOH溶液或H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,检测发光强度RLU。

## 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,进一步涉及在CLIA方法框架下对化学发光剂的优化和被标记抗体的结构改良,具体涉及一种竞争型化学发光标记免疫分析方法。

### 背景技术

[0002] 化学发光标记免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA),是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。CLIA是继放射免疫分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。化学发光标记免疫分析包含两个部分,即免疫反应系统和化学发光分析系统,免疫反应系统是利用抗原与抗体的特异性结合原理,特异性的识别待分析物,化学发光分析系统则是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化,形成一个激发态的中间体,当这种激发态中间体回到稳定的基态时,同时发射出光子(h $\nu$ ),利用发光信号)测量仪器可测量光量子产额。将发光物质(可在反应剂激发下生成激发态中间体直接标记在抗原或抗体上,抗体与待测分析物特异性结合,再加入催化剂或氧化剂,通过测定发光强度就可特异性测定待测分析物。

[0003] 化学发光标记免疫分析是通过化学发光物(吡啶酯类化合物等)共价偶联标记抗原或抗体,经启动发光试剂(NaOH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等)作用而发出强闪光的化学发光免疫分析方法。根据取代基的不同,常用作化学发光标记物的吡啶酯类化合物分为两类:吡啶酯和吡啶磺酰胺。它们的结构中都有共同的吡啶环。它们的发光机理相同:在碱性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液中,分子受到过氧化氢离子进攻时,生成不稳定的二氧乙烷,此二氧乙烷分解为CO<sub>2</sub>和电子激发态的N-甲基吡啶酮,当其回到基态时发出最大发射波长为430nm的光子。这类化合物从发光的机理来说特点是:①发光反应中在形成电子激发态中间体之前,联结于吡啶环上的不发光的取代基部分从吡啶环上脱离开来,即未发光部分与发光部分分离,因而其发光效率基本不受取代基结构的影响。②吡啶酯或吡啶磺酰胺类化合物化学发光不需要催化剂,在有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的稀碱性溶液中即能发光。因此应用于化学发光检测具有许多优越性。吡啶酯类化合物作为标记物用于免疫分析具有非特异性结合少、与大分子偶联不影响光量和光强度高等特点。

[0004] CLIA方法化学反应简单、灵敏度高、快速、无须催化剂,检测小分子抗原采用竞争法,检测大分子抗原则采用夹心法。有一些学者相继建立了CLIA方法,用于检测抗体、蛋白、激素、杀虫剂等抗原和半抗原。在DMAE-NHS、NSP-DMAE-NHS等新一代吡啶酯成功开发后,CLIA自动化检测方法在食品安全和临床检测中发挥了巨大的作用。

[0005] 然而,Weeks等在发明CLIA方法时就发现:在检测甲胎蛋白的CLIA中,抗体上偶联标记的吡啶酯的量不能太高(n<2.8),否则易造成抗体失活;Hage研究也发现,当提高吡啶酯与抗甲状旁腺激素抗体反应的比例时(2.5 $\mu$ g:50 $\mu$ g),有72%以上的抗体失活,当这一比例降到0.625 $\mu$ g:50 $\mu$ g时,仍有30%的抗体失活,需采用亲和柱纯化未失活抗体,操作繁琐、重复性不好。在这种情况下,现有技术中以吡啶酯为发光物的化学发光免疫分析方法普遍仅能在抗体上偶联低剂量的吡啶酯,这导致了检测过程中发光信号的强度较低、直接影响

了检测的灵敏性。此外,现有技术中常规的叫啶酯类化合物单位剂量发光水平仍有待提升,如果能在保证抗体结合性能的基础上通过结构改进以提升其化学发光水平,无疑将提升检测的灵敏性。

## 发明内容

[0006] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,以解决现有技术以叫啶酯为发光物的竞争型化学发光标记免疫分析方法中,抗体上无法结合较高剂量的叫啶酯类化合物从而制约了检测灵敏性的技术问题。

[0007] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术以叫啶酯为发光物的竞争型化学发光标记免疫分析方法中,常规的叫啶酯类化合物其发光水平有待提升。

[0008] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术的竞争型化学发光标记免疫分析方法检测灵敏性较低。

[0009] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0010] 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 包被抗原;

[0012] 2) 加入标记有化学发光剂的抗体和待测样品,混匀;

[0013] 3) 洗涤后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0014] 其中:所述化学发光剂是多聚叫啶酯;所述抗体是同时与多聚叫啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0015] 作为优选,所述多聚叫啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以叫啶酯为单体的多聚体。

[0016] 作为优选,所述多聚叫啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与叫啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚叫啶酯。

[0017] 作为优选,所述叫啶酯选自叫啶酯AE-NHS,叫啶酯DMAE-NHS,叫啶酯NSP-DMAE-NHS或叫啶磺酰胺内盐NSP-SA-NHS。

[0018] 作为优选,所述多聚叫啶酯分子中,叫啶酯单体的数量大于20。

[0019] 作为优选,所述抗体是通过以下方法制备的:

[0020] A) 取叫啶酯与载体蛋白偶联,得到叫啶酯人工抗原,利用所述叫啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗叫啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0021] B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A) 所得的分泌抗叫啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗叫啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

[0022] C) 培养步骤B) 所得的四源杂交瘤细胞,收集所述双特异性抗体。

[0023] 进一步优选的,所述小鼠是BALB/c小鼠;步骤A) 中所述细胞融合是取所述小鼠的脾细胞在50%PEG作用下与对数期生长的SP2/0细胞融合;细胞融合后对融合子的筛选是利用HAT和HT培养基进行选择培养实现的。

[0024] 作为优选,步骤A)中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吡啶酯单克隆抗体的解离常数小于 $2 \times 10^{-8}$ 。

[0025] 作为优选,步骤C)完成后继续执行步骤D):分别制备所述抗原偶联琼脂糖亲和柱和吡啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用所述抗原\吡啶酯双亲和柱纯化步骤C)所得的双特异性抗体。

[0026] 作为优选,所述分析方法的分析对象选自以下成分的其中一种:苏丹红,胭脂红,孔雀石绿,黄曲霉毒素B1,黄曲霉毒素B2,黄曲霉毒素M1,黄曲霉毒素M2,黄曲霉毒素G1,黄曲霉毒素G2,伏马毒素,呕吐毒素,赭曲霉毒素,玉米赤霉烯酮,青霉素,头孢类抗生素,喹诺酮类抗生素,硝基咪唑类抗生素。

[0027] 作为优选,该方法的分析对象是苏丹红I,该方法具体包括以下操作:苏丹红I人工抗原 $4^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,3%脱脂牛奶封闭,而后分别加入 $50\mu\text{L}$ 待测样品、 $50\mu\text{L}$ 抗苏丹红I\抗吡啶酯双特异性抗体、 $50\mu\text{L}$ 多聚吡啶酯,混匀后于 $37^{\circ}\text{C}$ 保持1h,利用PBST溶液洗涤4次,而后以 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 的量加入NaOH溶液或 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液,检测发光强度RLU。

[0028] 作为优选,所述具有多个氨基的蛋白选自BSA,OVA,壳聚糖或KLH。

[0029] 作为优选,所述多聚赖氨酸的分子量为15000~30000。

[0030] 在以上技术方案中,所述发光启动试剂又称为启动发光试剂或启动发光试剂,是指与作为底物的化学发光剂反应后可生成发光性物质的试剂,就本申请而言,以吡啶酯或多聚吡啶酯为化学发光剂时,发光启动试剂可依据本领域的一般技术常识进行适应性选择,所选择的发光启动试剂包括但不限于NaOH溶液、或 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液。

[0031] 在以上技术方案中,所述多聚吡啶酯(Polyacridinium)可自市面购得,亦可依据本发明提供的制备原理或具体制备方法制备获得。所述双特异性抗体可以通过化学交联法、杂合F(ab')<sub>2</sub>分子法、杂交瘤细胞法或基因工程方法制备的,其具体制备工艺可以依照本领域的一般技术常识进行常规选择,当然,也可以根据本发明所提供的制备方法制备获得。

[0032] 在利用本发明方法执行分析时,可以先利用该方法对一组具有浓度梯度且已知浓度的抗原标准溶液进行分析,以绘制出抗原浓度与发光强度RLU值之间的线性关系,而后再对待测样品执行检测,将检测结果带入上述线性关系以获得实际检测值。其中标注曲线的绘制是利用本发明方法绘制的,而其中抗原标准溶液浓度梯度的选择、图表模式的选择、误差的校正等可以依照本领域的一般技术常识确定。

[0033] 本发明提供了一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,该技术方案以抗待测抗原/抗吡啶酯的双特异性抗体替代现有技术中所使用的、仅与待测抗原具有抗原抗体反应活性的常规抗体,由于该双特异性抗体与待测抗原、吡啶酯均具有抗原抗体反应活性,因此可通过抗原抗体反应将吡啶酯与抗体结合,避免了化学偶联的方法仅能在抗体上偶联低剂量吡啶酯的技术问题,再加之本发明所选用的双特异性抗体对吡啶酯具有较高的亲和力(解离常数小于 $2 \times 10^{-8}$ ),从而进一步提升了化学发光剂的标记水平。在此基础上,为提升检测的灵敏性,本发明改进了化学发光剂的结构,以多聚体的形式替代单分子的吡啶酯,所得的多聚吡啶酯中单体数量大于20,提高了抗体上结合的吡啶酯数量,从而提高发光强度,可进一步提高CLIA方法的灵敏度。本发明采用的是固相竞争检测模式,分析物与固相抗原竞争结合限量的双特异性抗体,分析物愈多,结合到固相抗原上的双特异性抗体就愈少,从而

双特异性抗体结合的发光物质也就愈少,即分析物的浓度与发光强度成反比。

[0034] 本发明的具体技术优势还体现在以下方面:

[0035] 双特异性抗体与多聚发光物直接结合,使抗体分子上结合的发光物数量大大提高( $n>20$ ),可大幅度提高灵敏度。

[0036] 双特异性抗体将普通双价抗体的二个分析物结合位点转变为一个分析物结合位点和一个发光物结合位点,使达同样竞争抑制率所需分析物的数量减少,可提高灵敏度。

[0037] 将普通双价抗体与固相抗原间的双价结合转化为双特异性抗体的单价结合,降低了抗体与固相抗原的亲合力(单价结合的亲合力小于双价结合),相对提高了分析物与抗体的结合机会,使达同样竞争抑制率所需分析物的数量减少,从而可提高灵敏度。

## 附图说明

[0038] 图1是本发明方法的原理示意图。

[0039] 图2是本发明方法与常规的竞争型CLIA分析方法的原理对比示意图。

[0040] 图3是本发明实施例1中吡啶酯人工抗原的合成反应原理图。

[0041] 图4是本发明实施例1中双特异性抗体纯化的原理示意图。

[0042] 图5是本发明实施例1中多聚吡啶酯合成反应原理图。

[0043] 图6是本发明实施例1中利用本发明方法所建立的苏丹红I浓度-发光信号强度标准曲线图;图中,横坐标是苏丹红I浓度的常用对数值( $\lg C$ ),纵坐标是发光强度除以不含抗原的标准品的发光强度再乘以100% ( $B/B_0\%$ )。

[0044] 图7是本发明实施例2中利用常规CLIA方法建立的苏丹红I浓度-发光信号强度标准曲线图;图中,横坐标是苏丹红I浓度的常用对数值( $\lg C$ ),纵坐标是发光强度除以不含抗原的标准品的发光强度再乘以100% ( $B/B_0\%$ )。

## 具体实施方式

[0045] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0046] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0047] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解相同含义。

[0048] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0049] 实施例1(多聚吡啶酯-抗待测抗原/抗吡啶酯双特异性抗体的CLIA方法建立及其在分析物检测中的应用)

[0050] 本实施例利用多聚吡啶酯和抗苏丹红I/抗吡啶酯的双特异性抗体建立检测苏丹红I的化学发光标记免疫分析方法,使用的是竞争免疫检测的模式。本实施例以苏丹红I为目标分析物的代表,但不局限于苏丹红I,可能为染料分子(如苏丹红、胭脂红、孔雀石绿等)、生物毒素(如:黄曲霉毒素B1,B2,M1,M2,G1,G2、伏马毒素、呕吐毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等)、兽药残留(如:青霉素、头孢类抗生素、喹诺酮类抗生素、硝基咪唑类抗生素等)、激素、农药等一切可在体外与其相应抗体发生特异性结合的物质。

[0051] 1.1杂交瘤细胞技术制备抗吡啶酯高亲和力单克隆抗体

[0052] 制备吡啶酯与载体蛋白偶联的人工抗原(合成反应原理如图3所示),以优化的免疫程序、佐剂和剂量免疫BALB/c小鼠,取脾细胞在50%PEG作用下与对数期生长的SP2/0细胞融合,用HAT和HT培养基进行选择培养;建立吡啶酯人工抗原抗体捕获ELISA方法,筛选分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;采用抗体分型试剂盒鉴定抗体类型和亚类;无血清培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体;protein A亲和柱纯化单克隆抗体;竞争ELISA方法测定抗体亲和常数,筛选高亲和力抗体(解离常数小于 $2 \times 10^{-8}$ )。

[0053] 1.2四源杂交瘤细胞技术制备双特异性单克隆抗体

[0054] 采用8-氮鸟嘌呤处理分泌抗苏丹红I单抗细胞株,筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型(HGPRT<sup>-</sup>)细胞株;5-溴-2-脱氧尿嘧啶处理分泌抗吡啶酯单抗的杂交瘤细胞,筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型(TK<sup>-</sup>)细胞株。取对数期生长的二种细胞株在50%PEG作用下融合,用HAT培养基进行选择培养,建立苏丹红I人工抗原固相捕获双特异性单抗的CLIA方法,筛选分泌抗苏丹红I\抗吡啶酯的双特异性单克隆抗体的四瘤杂交细胞;无血清培养杂交瘤细胞生产双特异性抗体;

[0055] 1.3双特异性单克隆抗体的纯化

[0056] 分别制备苏丹红I配体偶联琼脂糖亲和柱和吡啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用苏丹红I\吡啶酯双亲和柱纯化抗苏丹红I\抗吡啶酯双特异性抗体。纯化原理如图4所示。

[0057] 1.4多聚吡啶酯的合成

[0058] 采用多聚赖氨酸(分子量15000-30000)或具有多个氨基的蛋白(如BSA,OVA,壳聚糖和KLH等)为载体,以吡啶酯制备多聚吡啶酯,AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化多聚吡啶酯,红外光谱、紫外可见光光谱及H-NMR鉴定分析,紫外分光计测定偶联比例(本实施例吡啶酯比多载体比例大于20),化学发光仪测定发光强度和发光稳定性。合成原理如图5所示。

[0059] 1.5多聚吡啶酯-抗苏丹红I\抗吡啶酯双特异性抗体竞争CLIA方法的建立及分析物检测

[0060] 采用棋盘滴定法确定苏丹红I人工抗原包被浓度、抗苏丹红I\抗吡啶酯双特异性抗体工作浓度、多聚吡啶酯的使用浓度。根据确定的最佳的包被抗原、双特异性抗体和多聚吡啶酯工作浓度,建立竞争CLIA标准曲线并检测样品;实验过程如下:苏丹红I人工抗原4℃包被过夜,3%脱脂牛奶封闭。加入不同浓度的苏丹红I标准品(0.005ng/ml,0.01ng/ml,0.02ng/ml,0.05ng/ml,0.1ng/ml,0.2ng/ml,0.5ng/ml,1ng/ml,2ng/ml,5ng/ml,10ng/ml)50μL、双特异性抗体50μL和多聚吡啶酯50μL,混匀。37℃1h后,PBST洗涤4次,自动注射泵加入启动发光试剂(NaOH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等)(100μL/孔);发光仪测发光强度(RLU)。获得的各标准品的发光强度除以0浓度标准品的发光强度再乘以100,得出百分比值(B/B<sub>0</sub>%)。以各标准品浓度的常用对数值(1gC)为横坐标,B/B<sub>0</sub>%值为纵坐标绘制一个对应标准品浓度的半对数坐标

曲线图(如图6所示)并检测样品;从标准曲线中查出 $B/B_0\%$ 为50%时对应的标准品浓度为 $IC_{50}$ 。(共需测定6次,标准曲线和 $IC_{50}$ 可通过专用CLIA分析软件确定)。

[0061] 实施例2(基于双特异性抗体的CLIA方法与传统的CLIA方法比较)

[0062] 2.1传统竞争CLIA方法的建立

[0063] 吡啶酯标记抗苏丹红I抗体,紫外分光计测定偶联比例,化学发光仪测定发光强度,采用棋盘滴定法确定苏丹红I人工抗原(或抗BSA一抗)包被浓度、吡啶酯标记抗体工作浓度。根据确定的最佳的苏丹红I人工抗原(或抗BSA一抗)包被浓度和吡啶酯标记抗体浓度,建立竞争CLIA方法标准曲线并检测样品。简要过程如下:苏丹红I人工抗原 $4^{\circ}C$ 包被过夜,3%脱脂牛奶封闭。加入不同浓度的苏丹红I标准品(0.01ng/ml,0.02ng/ml,0.05ng/ml,0.1ng/ml,0.2ng/ml,0.5ng/ml,1ng/ml,2ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,20ng/ml,50ng/ml)50 $\mu$ L、吡啶酯标记抗苏丹红I抗体50 $\mu$ L,混匀。 $37^{\circ}C$  1h后,PBST洗涤4次,自动注射泵加入启动发光试剂(NaOH、 $H_2O_2$ 等)(100 $\mu$ L/孔);发光仪测发光强度(RLU)。获得的各标准品的发光强度除以0浓度标准品的发光强度再乘以100,得出百分比值( $B/B_0\%$ )。以各标准品浓度的常用对数值(1gC)为横坐标, $B/B_0\%$ 值为纵坐标绘制一个对应标准品浓度的半对数坐标曲线图(如图7所示)并检测样品。从标准曲线中查出 $B/B_0\%$ 为50%时对应的标准品浓度为 $IC_{50}$ 。(共需测定6次,标准曲线和 $IC_{50}$ 可通过专用CLIA分析软件确定)。

[0064] 2.2以上1.5节所建立方法与2.1节所建立方法在检测限度、精密度和准确度方面的测定与比较

[0065] 检测限的测定:取20份空白样品,使用二种不同CLIA方法进行测定,平均测定值加3倍标准差为检测限。精密度和准确度的测定:在空白样品中添加线性范围内二个浓度(2 $\mu$ g/kg,10 $\mu$ g/kg)的苏丹红I标准品;根据同样的方法进行样品提取,用二种不同CLIA方法进行测定,每个添加浓度测定6个平行样,并进行3批实验。准确度:以回收率[(测定量/添加量) $\times 100\%$ ]表示。精密度:以变异系数[(标准差/平均测定量) $\times 100\%$ ]表示。批内变异系数:每批平行样之间的变异系数。批间变异系数:不同批次测定样品之间的变异系数值。实验结果如表1所示。

[0066] 表1两种方法在检测限、精密度和准确度方面的测定与比较

[0067]

方法	检测限	添加量	回收率	批内变异系数	批间变异系数
双特异性抗体 CLIA	0.02ng/ml	2 $\mu$ g/kg	96.5%	7.65%	10.72%
		10 $\mu$ g/kg	89.23%	6.38%	9.72%
传统 CLIA	1.25ng/ml	2 $\mu$ g/kg	89.5%	8.31%	10.21%
		10 $\mu$ g/kg	92.15%	9.62%	13.45%

[0068] 由表1可以发现,基于双特异性抗体的CLIA方法比传统的CLIA方法检测限明显降低,灵敏度显著提高,而准确度和精密度无显著差异。

[0069] 实施例3

[0070] 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0071] 1) 包被抗原;

[0072] 2) 加入标记有化学发光剂的抗体和待测样品,混匀;

[0073] 3) 洗涤后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0074] 其中:所述化学发光剂是多聚吖啶酯;所述抗体是同时与多聚吖啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0075] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0076] 所述多聚吖啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吖啶酯为单体的多聚体。

[0077] 所述多聚吖啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与吖啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚吖啶酯。

[0078] 所述吖啶酯是吖啶酯AE-NHS。

[0079] 所述多聚吖啶酯分子中,吖啶酯单体的数量大于20。

[0080] 所述抗体是通过以下方法制备的:

[0081] A) 取吖啶酯与载体蛋白偶联,得到吖啶酯人工抗原,利用所述吖啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吖啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0082] B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A) 所得的分泌抗吖啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗吖啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

[0083] C) 培养步骤B) 所得的四源杂交瘤细胞,收集所述双特异性抗体。

[0084] 步骤A) 中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吖啶酯单克隆抗体的解离常数为 $0.8 \times 10^{-8}$ 。

[0085] 步骤C) 完成后继续执行步骤D): 分别制备所述抗原偶联琼脂糖亲和柱和吖啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用所述抗原\吖啶酯双亲和柱纯化步骤C) 所得的双特异性抗体。

[0086] 所述分析方法的分析对象是黄曲霉毒素G1。

[0087] 实施例4

[0088] 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0089] 1) 包被抗原;

[0090] 2) 加入标记有化学发光剂的抗体和待测样品,混匀;

[0091] 3) 洗涤后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0092] 其中:所述化学发光剂是多聚吖啶酯;所述抗体是同时与多聚吖啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0093] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0094] 所述多聚吖啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吖啶酯为单体的多聚体。

[0095] 所述吖啶酯是吖啶酯NSP-DMAE-NHS。

[0096] 所述抗体是通过以下方法制备的:

[0097] A) 取吡啶酯与载体蛋白偶联,得到吡啶酯人工抗原,利用所述吡啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0098] B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A)所得的分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗吡啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

[0099] C) 培养步骤B)所得的四源杂交瘤细胞,收集所述双特异性抗体。

[0100] 所述杂交瘤细胞所分泌的抗吡啶酯单克隆抗体的解离常数是 $1.5 \times 10^{-8}$ 。

[0101] 所述分析方法的分析对象是玉米赤霉烯酮。

[0102] 实施例5

[0103] 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0104] 1) 包被抗原;

[0105] 2) 加入标记有化学发光剂的抗体和待测样品,混匀;

[0106] 3) 洗涤后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0107] 其中:所述化学发光剂是多聚吡啶酯;所述抗体是同时与多聚吡啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0108] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0109] 所述多聚吡啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与吡啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚吡啶酯。

[0110] 所述吡啶酯是吡啶酯DMAE-NHS。

[0111] 所述分析方法的分析对象是硝基呋喃类抗生素。

[0112] 实施例6

[0113] 一种竞争型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0114] 1) 包被抗原;

[0115] 2) 加入标记有化学发光剂的抗体和待测样品,混匀;

[0116] 3) 洗涤后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0117] 其中:所述化学发光剂是多聚吡啶酯;所述抗体是同时与多聚吡啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0118] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

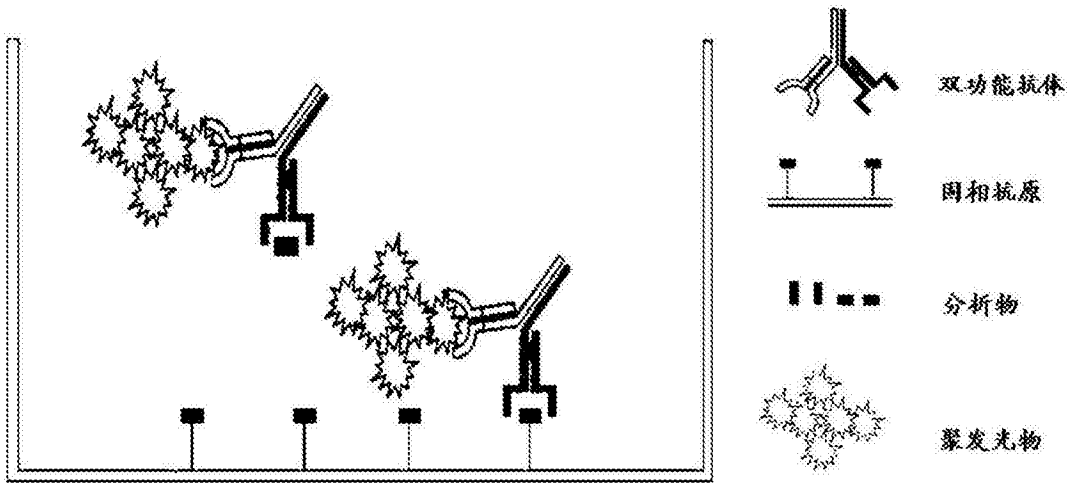


图1

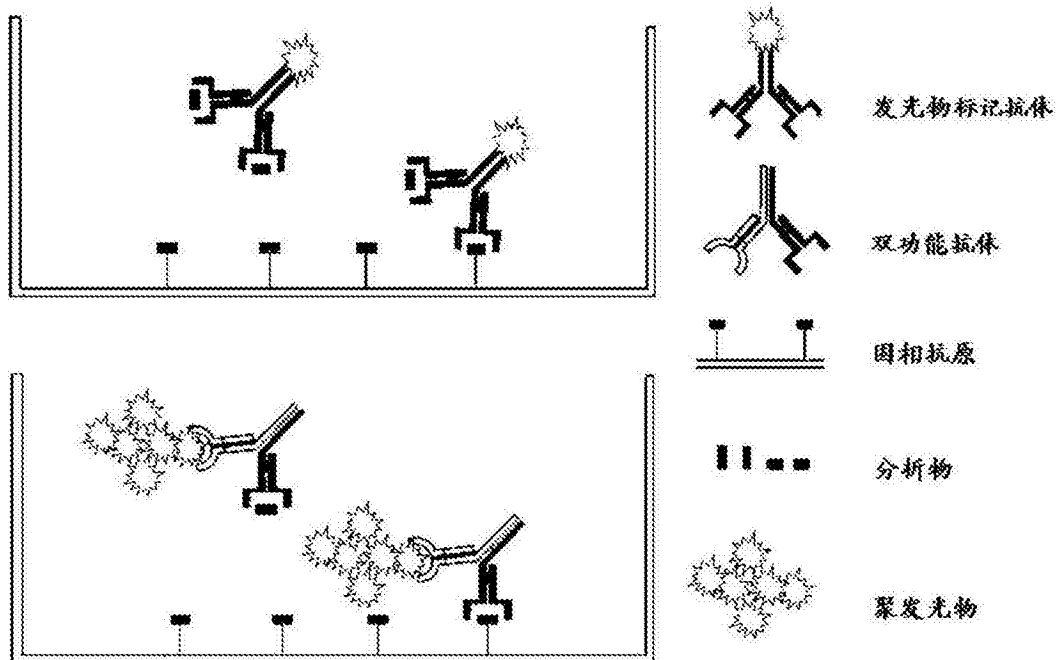


图2

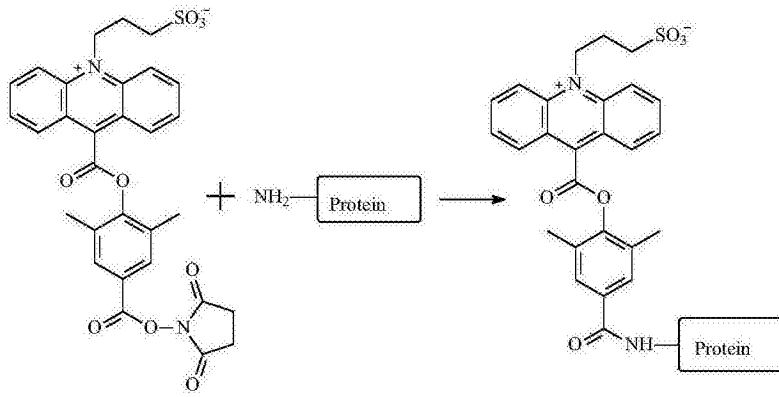


图3

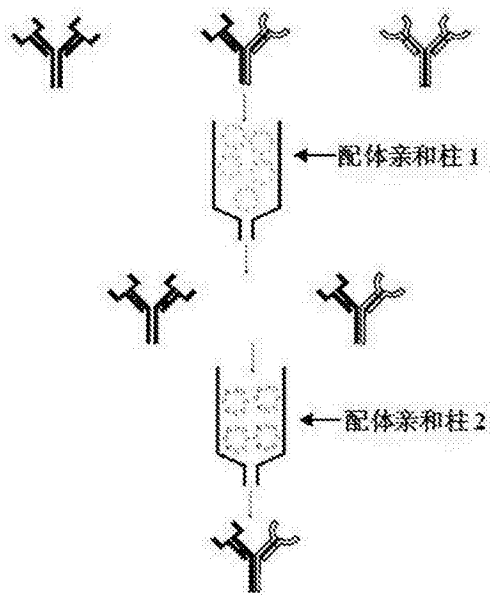


图4

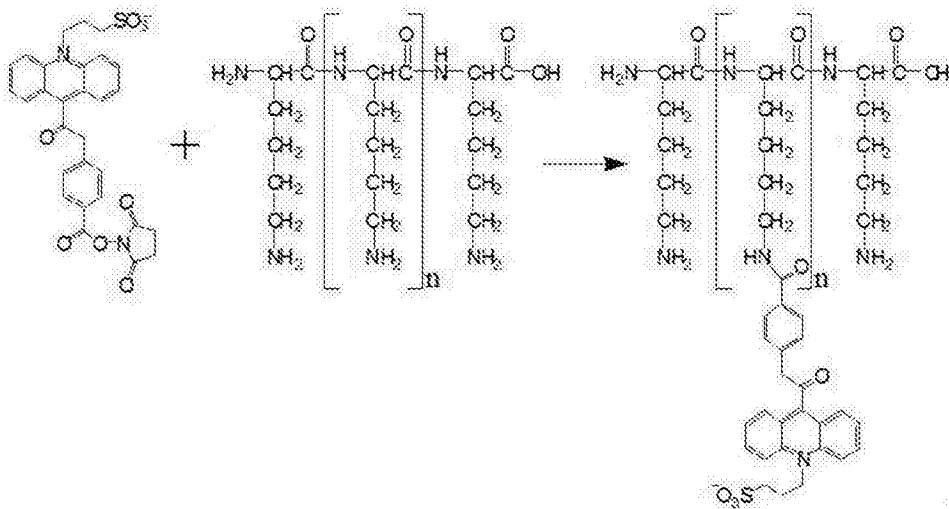


图5

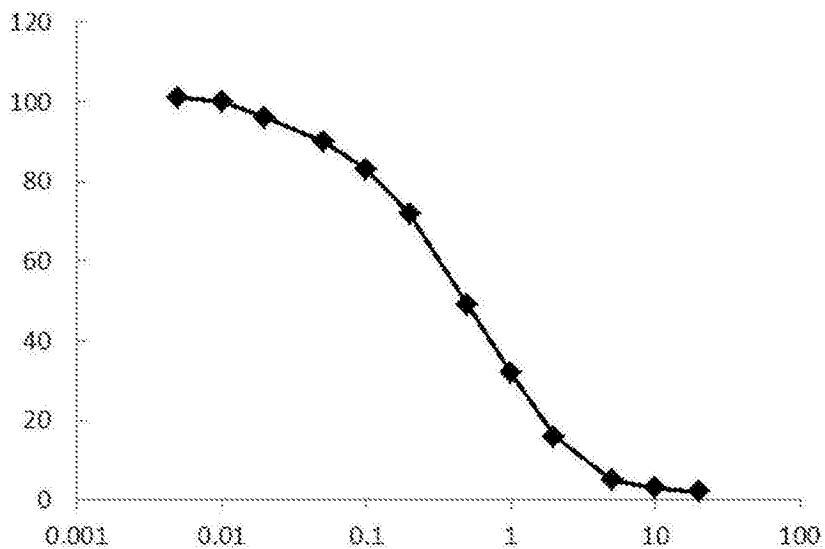


图6

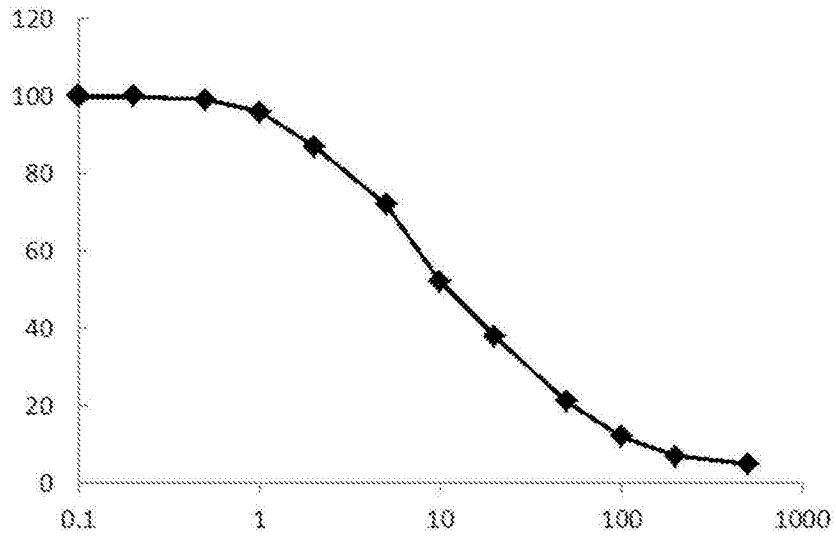


图7

专利名称(译)	一种竞争型化学发光标记免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106980016A</a>	公开(公告)日	2017-07-25
申请号	CN201710196765.0	申请日	2017-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
[标]发明人	刘仁荣		
发明人	刘仁荣		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N21/33		
CPC分类号	G01N33/532 G01N21/33 G01N33/54306		
优先权	201611060049.1 2016-11-28 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">SIPO</a>	

摘要(译)

本发明提供了一种竞争型化学发光标记免疫分析方法，该技术方案以抗待测抗原/抗吖啶酯的双特异性抗体替代了仅与待测抗原具有抗原抗体反应活性的常规抗体，由于该双特异性抗体与待测抗原、吖啶酯均具有抗原抗体反应活性，因此可通过抗原抗体反应将吖啶酯与抗体结合，避免了化学偶联的方法仅能在抗体上偶联低剂量吖啶酯的技术问题，再加之本发明所选用的双特异性抗体对吖啶酯具有较高的亲和力，从而进一步提升了化学发光剂的标记水平。在此基础上，本发明改进了化学发光剂的结构，以多聚体的形式替代单分子吖啶酯，所得的多聚吖啶酯中单体数量大于20，提高了抗体上结合的吖啶酯数量，从而提高了发光强度，进而提升了CLIA方法的灵敏性。

