



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107976539 B

(45)授权公告日 2019.12.10

(21)申请号 201711083351.3

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.11.07

G01N 33/569(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 刘迎鸣

申请公布号 CN 107976539 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(73)专利权人 成都赛普克生物科技股份有限公司

地址 610000 四川省成都市蒲江县鹤山镇
飞虎路97号

(72)发明人 叶成栋 刘军 郭沛

(74)专利代理机构 成都巾帼知识产权代理有限公司 51260

代理人 林娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种降低酶联免疫法包被后本底的方法

(57)摘要

本发明公开了一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,包括制备包被液、包被和封闭。本发明的有益效果是:本发明提供一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,该方法在蛋白包被液中,增加大分子物质表面活性剂S6,再经封闭处理,可显著降低空白包被的非特异性吸附及后续的本底,提高特异性蛋白包被后的检测效果,本发明方法经济、简便、快速,适用于工业化大规模生产。

1. 一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,其特征在于,它包括以下步骤:

S1. 制备包被液: 取0.05M碳酸盐溶液,加入质量百分比浓度为1%的大分子物质表面活性剂S6,混合均匀,即为包被液;

S2. 包被:取包被蛋白抗原,加入步骤S1制备的包被液,2~8℃过夜放置12~16h,丢弃液体;其中,所述包被蛋白抗原为结核分枝杆菌38KD蛋白或结核菌分泌型酸性磷酸酶;

S3. 封闭:将步骤S2包被后的蛋白抗原中加入质量百分比浓度为1%的牛血清白蛋白的PBS缓冲液进行封闭,37℃放置1.5~2.5h。

2. 如权利要求1所述的一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,其特征在于,步骤S1中所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为10000:5~20。

3. 如权利要求1所述的一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,其特征在于,步骤S1中所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为1000:1。

一种降低酶联免疫法包被后本底的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学检测技术领域,具体涉及一种降低酶联免疫法包被后本底的方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附剂测定法,简称酶联免疫法,或者ELISA法。它的中心就是让抗体与酶复合物结合,然后通过显色来检测。1971年瑞典学者Engvail和Perlmann,荷兰学者Van Weerman 和Schuurs分别报道将免疫技术发展为检测体液中微量物质的固相免疫测定方法,即酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay,ELISA)。ELISA现在已成为目前分析化学领域中的前沿课题,它是一种特殊的试剂分析方法,是在免疫酶技术(immuoenzymatic techniques)的基础上发展起来的一种新型的免疫测定技术。

[0003] 酶联免疫法的基本原理是:①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅来进行定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

[0004] ELISA可用于测定抗原,也可用于测定抗体。在这种测定方法中有3种必要的试剂:

[0005] ①固相的抗原或抗体

[0006] ②酶标记的抗原或抗体

[0007] ③酶作用的底物。根据试剂的来源和标本的性状以及检测的具备条件,可设计出各种不同类型的检测方法。

[0008] 但是,正式试验时,虽然分别以阳性对照与阴性对照控制试验条件,待检样品应作一式二份,以保证实验结果的准确性。而在抗原抗体反应过程中存在本底较高的情况,说明有非特异性反应,目前常用碳酸盐包被蛋白,经封闭干燥等处理来降低本底,但是,通过上述方法处理后检测血清中的抗体,可能会存在不同程度的假反应,比如抗体和包被抗原非特异性的作用等,降低了反应的特异性,因此,影响检测效果。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于克服现有技术的缺点,提供一种降低酶联免疫法包被后本底的方法。

[0010] 本发明的目的通过以下技术方案来实现:一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,它包括以下步骤:

[0011] S1. 制备包被液:取0.05M碳酸盐溶液,加入质量百分比浓度为1%的大分子物质表

面活性剂 S6,混合均匀,即为包被液;

[0012] S2.包被:取包被蛋白抗原,加入步骤S1制备的包被液,2~8℃过夜放置12~16h,丢弃液体;

[0013] S3.封闭:将步骤S2包被后的蛋白抗原中加入质量百分比浓度为1%的牛血清白蛋白的PBS 缓冲液进行封闭,37℃放置1.5~2.5h。

[0014] 进一步地,步骤S1中所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为10000:5~ 20。

[0015] 进一步地,步骤S1中所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为1000:1。

[0016] 进一步地,步骤S2中所述包被蛋白抗原为结核分枝杆菌38KD蛋白。

[0017] 进一步地,步骤S2中所述包被蛋白抗原为结核菌分泌型酸性磷酸酶。

[0018] 本发明具有以下优点:本发明提供一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,该方法在蛋白包被液中,增加大分子物质表面活性剂S6,再经封闭处理,可显著降低空白包被的非特异性吸附及后续的本底,提高特异性蛋白包被后的检测效果,本发明方法经济、简便、快速,适用于工业化大规模生产。

具体实施方式

[0019] 下面结合实施例对本发明做进一步的描述,本发明的保护范围不局限于以下所述:

[0020] 实施例1:一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,它包括以下步骤:

[0021] S1.制备包被液:取0.05M碳酸盐溶液,加入质量百分比浓度为1%的大分子物质表面活性剂S6,混合均匀,即为包被液;所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为 10000:5;

[0022] S2.包被:取包被蛋白抗原结核分枝杆菌38KD蛋白,加入步骤S1制备的包被液,4℃过夜放置12h,丢弃液体;

[0023] S3.封闭:将步骤S2包被后的蛋白抗原中加入质量百分比浓度为1%的牛血清白蛋白的 PBS缓冲液进行封闭,37℃放置1.5h。

[0024] 实施例2:一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,它包括以下步骤:

[0025] S1.制备包被液:取0.05M碳酸盐溶液,加入质量百分比浓度为1%的大分子物质表面活性剂S6,混合均匀,即为包被液;所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为 10000:20;

[0026] S2.包被:取包被蛋白抗原结核分枝杆菌38KD蛋白或结核菌分泌型酸性磷酸酶,加入步骤S1制备的包被液,8℃过夜放置16h,丢弃液体;

[0027] S3.封闭:将步骤S2包被后的蛋白抗原中加入质量百分比浓度为1%的牛血清白蛋白的PBS缓冲液进行封闭,37℃放置2.5h。

[0028] 实施例3:一种降低酶联免疫法包被后本底的方法,它包括以下步骤:

[0029] S1.制备包被液:取0.05M碳酸盐溶液,加入质量百分比浓度为1%的大分子物质表面活性剂S6,混合均匀,即为包被液;所述碳酸盐溶液与大分子物质表面活性剂S6的体积比为 1000:1;

[0030] S2.包被:取包被蛋白抗原结核分枝杆菌38KD蛋白或结核菌分泌型酸性磷酸酶,加入步骤S1制备的包被液,6℃过夜放置14h,丢弃液体;

[0031] S3.封闭:将步骤S2包被后的蛋白抗原中加入质量百分比浓度为1%的牛血清白蛋白的 PBS缓冲液进行封闭,37℃放置2h。

[0032] 以下通过实验说明本发明的有益效果:

[0033] 一、缓冲液空白包被,本底水平测定

[0034] 1.配制0.05M的碳酸盐缓冲液,具体配制方法:称量碳酸钠1.59克、碳酸氢钠2.93克,用纯化水溶解并定容至1000mL。

[0035] 2.PBS缓冲液配制,方法:称量氯化钠8.0克、氯化钾0.2克、12水磷酸氢二钠3.58克、磷酸二氢钾0.24克,用纯化水溶解并定容至1000mL。

[0036] 3.0.05M的碳酸盐缓冲液不加任何蛋白质,包被常规酶标板(微孔板),每孔100μL,2-8℃放置过夜(12-16小时),丢弃液体。

[0037] 4.用PBS缓冲液洗板2次,部分直接晾干,塑封待用,部分用含有1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS缓冲液封闭,37℃放置2小时,再用PBS缓冲液洗板2次,晾干塑封待用。

[0038] 5.将上述两种条件下制备的空白对照板用于检测,检测方法:

[0039] PBST的配制:PBS缓冲液100mL加入0.5mL的吐温-20。

[0040] 抗人的辣根过氧化物酶酶、显色剂A液:醋酸钠13.6克、柠檬酸1.6克、30%双氧水0.3mL 加纯化水至500mL;显色剂B液:乙二胺四乙酸二钠0.2克、柠檬酸0.95克、甘油50mL、0.15 克TMB加入到DMSO 10mL溶解后,加入到400mL的纯化水中,最后定容至500mL;终止液:2M的硫酸水溶液。

[0041] 1)用该缓冲液将人血清稀释20倍用来检测,加入到上述的包微孔板中,100μL/孔,测定了24份样品。

[0042] 37℃孵育30分钟,取出,用PBST洗板5次。

[0043] 2)加入辣根过氧化物酶酶,100μL/孔,37℃孵育20分钟,取出,用PBST洗板5次。

[0044] 3)将显色剂A、B液等体积混合,加入100μL/孔,37℃孵育10分钟,加终止液读值。

[0045] 实验结果如表1和表2所示。

[0046] 表1:未加BSA封闭板的OD值

编号	测定的 OD 值											
[0047] 1-12	0.25	0.27	0.23	0.19	0.26	0.28	0.31	0.24	0.26	0.24	0.22	0.24
13-24	0.29	0.22	0.35	0.27	0.28	0.24	0.24	0.29	0.37	0.30	0.27	0.31

[0048] 表2:加BSA封闭板的OD值

编号	测定的 OD 值											
[0049] 1-12	0.16	0.18	0.14	0.10	0.16	0.15	0.28	0.17	0.17	0.19	0.17	0.18
13-24	0.23	0.13	0.31	0.19	0.20	0.17	0.16	0.26	0.34	0.21	0.19	0.22

[0050] 从表1和表2可知:理论上值应该很低,BSA封闭能降低本底,但是还是偏高,对后续的检测产生影响。

[0051] 6.使用大分子物质(表面活性剂S6),将其加入到0.05M的碳酸盐包被液中,比例为

10mL 包被液加入1%的表面活性剂S6 5 μ L、10 μ L和20 μ L。表面活性剂S6由上海西宝生物科技有限公司提供。

[0052] 按照上述方法检测,结果如表3、表4和表5所示。

[0053] 表3:加入1%的表面活性剂S6 5 μ L表面活性剂S6的OD值

编号	测定的 OD 值											
[0054] 1-12	0.08	0.10	0.12	0.09	0.12	0.15	0.18	0.09	0.10	0.13	0.11	0.09
13-24	0.13	0.08	0.16	0.11	0.12	0.10	0.11	0.13	0.20	0.15	0.12	0.18

[0055] 从表3可知,OD值下降明显。

[0056] 表4:加入1%的表面活性剂S6 10 μ L的OD值

编号	测定的 OD 值											
[0058] 1-12	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.07	0.07	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06
13-24	0.06	0.05	0.08	0.06	0.05	0.05	0.06	0.07	0.10	0.06	0.07	0.10

[0059] 从表4可知:OD值基本降到较低水平,可用于后续检测。

[0060] 表5:加入1%的表面活性剂S6 20 μ L的OD值

编号	测定的 OD 值											
[0061] 1-12	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05
13-24	0.06	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.07	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06

[0062] 从表5可知:几乎各孔无差异。

[0063] 可见,加入1%的表面活性剂S6 10 μ L基本能达到预期降低本底的目标。可以显著的降低空白包被的非特异性吸附及后续的本底。

[0064] 二、增加到蛋白包被系统,检测效果

[0065] 以结核菌分泌型酸性磷酸酶 (SAMP) 为蛋白抗原,检测阳性和阴性血清。

[0066] 一组:按照常规程序,用0.05M的碳酸盐缓冲液包被SAMP蛋白,1 μ g/孔,每孔100 μ L,2-8 $^{\circ}$ C放置过夜(12-16小时),丢弃液体。

[0067] 用PBS缓冲液洗板2次,用含有1%牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS缓冲液封闭,37 $^{\circ}$ C放置2小时,再用PBS缓冲液洗板2次,晾干塑封待用。

[0068] 二组:在0.05M的碳酸盐缓冲液中,按照10mL加入10 μ L 1%的表面活性剂S6后,包被 SAMP蛋白,1 μ g/孔,每孔100 μ L,2-8 $^{\circ}$ C放置过夜(12-16小时),丢弃液体。

[0069] 用PBS缓冲液洗板2次,用含有1%牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS缓冲液封闭,37 $^{\circ}$ C放置2小时,再用PBS缓冲液洗板2次,晾干塑封待用。

[0070] 按照一中5的检测方法,检测10份血清,阳性和阴性各5份,结果入表6和表7所示:

[0071] 表6:一组检测结果

	阳性					阴性				
[0072] 编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
检测 OD 值	0.85	1.32	1.56	1.01	0.65	0.24	0.21	0.19	0.35	0.51

[0073] 表7:二组检测结果

	阳性					阴性				
[0074] 编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0075] 检测 OD 值	0.76	1.18	1.29	0.86	0.51	0.07	0.11	0.09	0.15	0.22

[0076] 由表6和表7可知:阳性有微弱的下降,阴性下降明显,减少的非特异性反应。按照这种工艺方法生产,提高了整体的检测效果。

[0077] 因此,本发明方法降低了阴性本底,拉开了阳性和阴性的区分度。提高特异性蛋白包被后的检测效果。对其他蛋白的包被也能起到相应的作用。

专利名称(译)	一种降低酶联免疫法包被后本底的方法		
公开(公告)号	CN107976539B	公开(公告)日	2019-12-10
申请号	CN2017111083351.3	申请日	2017-11-07
[标]发明人	叶成栋 刘军 郭沛		
发明人	叶成栋 刘军 郭沛		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/5695 G01N2333/35		
代理人(译)	林娜		
其他公开文献	CN107976539A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种降低酶联免疫法包被后本底的方法，包括制备包被液、包被和封闭。本发明的有益效果是：本发明提供一种降低酶联免疫法包被后本底的方法，该方法在蛋白包被液中，增加大分子物质表面活性剂S6，再经封闭处理，可显著降低空白包被的非特异性吸附及后续的本底，提高特异性蛋白包被后的检测效果，本发明方法经济、简便、快速，适用于工业化大规模生产。

编号	测定的OD值											
	1-12	0.25	0.27	0.23	0.19	0.26	0.28	0.31	0.24	0.26	0.24	0.22
13-24	0.29	0.22	0.35	0.27	0.28	0.24	0.24	0.29	0.37	0.30	0.27	0.31