



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101825628 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 201010163062.6

(22) 申请日 2010.05.04

(71) 申请人 武汉伊艾博科技有限公司

地址 430074 湖北省武汉市东湖开发区关东园路2-2号光谷国际商会大厦1栋A座17层10号

(72) 发明人 费小战 齐兵玉 王凯 李学斌

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 涂洁

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

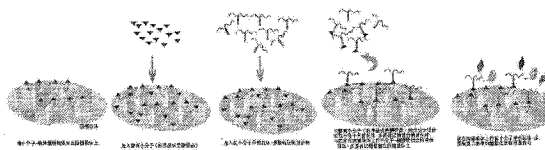
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 4 页

(54) 发明名称

抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测试剂盒及其使用方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测小分子的试剂盒及其使用方法和应用,解决了目前试剂盒制备工艺复杂、使用竞争法检测小分子存在人为误差、测量准确性差、灵敏度低的问题。试剂盒包括固相载体、小分子标准品、标记物复合物,所述固相载体为固定有小分子-载体藕联物的固相载体,所述标记物复合物为单价抗体-多聚标记物复合物。本发明工艺采用抗体单价化多聚标记技术,放大了原始信号,大大提高灵敏度,浓度变化对信号值的影响被放大,大大提高两点之间线性斜率,更容易检出更低浓度的被检物。



1. 一种抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫法检测小分子的试剂盒,包括固相载体、小分子标准品、标记物复合物,其特征在于,所述固相载体为固定有小分子-载体藕联物的固相载体,所述标记物复合物为单价抗体-多聚标记物复合物。

2. 如权利要求1所述的抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测试剂盒,其特征在于,所述单价抗体-多聚标记物复合物由下述方法制备而成:(1) 特异性抗体单价化及单价抗体的纯化:用木瓜蛋白酶消化抗体成Fc片断和Fab片段,制备抗Fab片段抗体的Sepharose柱,通过亲和层析方法纯化Fab片段,得到单价化抗体片断;(2) 标记物与多聚载体的藕联,按照标记物的本身特性与载体藕联,让其在载体上形成多聚或者串珠结构,得到多聚标记物;(3) 将步骤(1)中得到的单价抗体片断与步骤(2)中得到的多聚标记物按照1:1藕联得到单价抗体-多聚标记物复合物。

3. 如权利要求1或2所述的抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测试剂盒,其特征在于,所述固定有小分子-载体藕联物固相载体由下述方法制成:先将小分子与载体蛋白藕联得到小分子-载体藕联物,然后,将其固定或者藕联到固相载体上得到固定有小分子-载体藕联物固相载体。

4. 如权利要求2所述的抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测试剂盒,其特征在于,步骤(2)中所述多聚载体为多聚赖氨酸,葡聚糖或聚乙二醇。

5. 如权利要求1-4任一项所述免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于:(1) 向小分子-载体藕联物的固相载体中加入小分子标准品或待测样品;(2) 加入单价抗体-多聚标记物复合物,使小分子标准品或待测样品与固定化的小分子-载体藕联物同步竞争与单价抗体-多聚标记物复合物结合;(3) 加入标记用酶对应的底物显色,终止反应后通过酶标仪特定波长记录吸光值,或使用荧光标记物的直接读取荧光数值;(4) 绘制标准品曲线,计算待检物浓度。

6. 如权利要求5所述免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于:所述步骤(2)中小分子标准品或待测样品与固定化的小分子-载体藕联物同步竞争与单价抗体-多聚酶复合物在37℃反应45-90分钟。

7. 权利要求1-4中任一项试剂盒在竞争免疫法检测小分子中的应用。

抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测试剂盒及其使用方法

和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种竞争免疫法检测小分子的试剂盒及其使用方法和应用,具体的说是一种抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测小分子的试剂盒及其使用方法和应用。

背景技术

[0002] 小分子(是指由于分子量小或抗原结合位点少难于用双抗体夹心法检测的分子)免疫检测往往采用竞争法进行,该方法首先将抗体固定于固相载体,通过小分子标记酶(如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶)-底物,荧光标记物(如异硫氰酸荧光素(FITC),异硫氰酸罗丹明(TRITC)等)或者其他标记物等信号呈现系统来实现测量或者测定小分子的目的(方法一,参见图1)。这种测定或测量模式中,首先需要得到小分子与标记物的结合物,而小分子标记物结合物一则在制备上不如抗体-标记物结合物简便,二则其纯化亦颇为困难,结合有小分子的酶与游离酶之间难于分离;另外这种方法所存在的弊端是,在具体实验操作中游离小分子(小分子标准品或待测样品)与小分子标记物难以同步加入,由此造成不同平行组间,两者加入之间的时间差很难控制,这样先加入的小分子优先与固定化的抗体结合,优先占据抗体的抗原结合位点,后加入的小分子标记物所能拥有能够结合的位点多少也不同,这样就容易造成竞争不同步的问题,竞争法免疫检测的信号与待检样品的含量本来就是呈现的是反向相关性,误差大,再加上以上所谓的人为操作误差将大大降低检测产品的测量准确性。

[0003] 国外有些公司为了解决这个问题,先在固相载体上固定一个抗Fc片断的抗抗体,在实验过程中先后分别加入游离的小分子(标准品或待检样品)和小分子-载体蛋白-标记物复合物,最后加入针对小分子的特异性抗体,抗体加入以后,游离的小分子(标准品或待检样品)和小分子-载体蛋白-标记物复合物同时与针对小分子的特异性抗体同步竞争结合,针对小分子的特异性抗体被固定在固相载体上的抗Fc片断的抗抗体结合捕捉下来,最后通过信号呈现系统记录数值(方法二,参见图2)。这种方法的不足是:抗体用量大,而且要先包被抗Fc片断的抗抗体,试剂盒生产和使用步骤繁琐;只有抗小分子特异性抗体同时与抗Fc抗抗体和小分子-蛋白载体-标记物复合物同时结合才能捕捉记录为有效信号,这种检测方法的敏感性不高。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决上述传统技术问题,提供一种误差小、检测限度高、竞争法实验的线性曲线的线性系数高的检测试剂盒及其应用。

[0005] 本发明的另一目的是提供上述检测试剂盒的使用方法。

[0006] 本发明检测试剂盒包括固相载体、小分子标准品、标记物复合物,所述固相载体为固定有小分子-载体藕联物的固相载体,所述标物物复合物为单价抗体-多聚标记物复合物。

[0007] 所述单价抗体-多聚标记物复合物由下述方法制备而成:(1) 特异性抗体单价化及单价抗体的纯化:用木瓜蛋白酶消化抗体成 Fc 片断和 Fab 片段,制备抗 Fab 片段抗体的 Sepharose 柱,通过亲和层析方法纯化 Fab 片段,得到单价化抗体片断;(2) 标记物与多聚载体的藕联,按照标记物的本身特性与载体藕联,让其在载体上形成多聚或者串珠结构,得到多聚标记物;(3) 将步骤(1)中得到的单价化抗体片断与步骤(2)中得到的多聚标记物按照 1:1 藕联得到单价抗体-多聚标记物复合物。

[0008] 所述固定有小分子-载体藕联物固相载体由下述方法制成:先将载体蛋白与小分子藕联得到小分子-载体藕联物,然后将其包被或者藕联到固相载体上得到固定有小分子-载体藕联物固相载体。

[0009] 步骤(2)中所述多聚载体为多聚赖氨酸,葡聚糖或聚乙二醇。

[0010] 为了解决现有技术中的不足,本发明考虑直接在固相载体上包被小分子-载体藕联物,然后将标记物直接标记在抗体上形成单价抗体-多聚标记物复合物;这样在操作时就很容易实现游离小分子(小分子标准品或待测样品)与小分子藕联物与抗体的同步竞争反应(原理见图三)。

[0011] 但是通常抗体有两个结合位点,很容易与游离小分子(小分子标准品或待测样品)和固定在固相载体上的小分子-载体藕联物同时结合,但是由于本试剂盒是反相竞争免疫检测法,增加了信号值就相当于减低小分子标准样品或者待测样品的含量,从而严重影响测试的准确性,因此必需使抗体单价化。

[0012] 为达到上述目的,发明人采用了如下方法制备标记物复合物:将抗体经过单价化处理后与经多聚载体藕联的标记物共价结合,通过控制单价抗体与多聚酶的比例 1:1,保证每个单价抗体-多聚酶复合物中只有一个单价抗体。所述抗体的单价化处理可以采用木瓜蛋白酶切割成 Fab 片断或者通过基因工程生产单链抗体。

[0013] 本发明通过将抗体单价化保证每个单价抗体-多聚酶复合物中只有一个抗原结合位点,避免同时与游离小分子和固定在固相载体上的小分子-载体藕联物结合,同时由于本发明采用多聚标记技术,放大了原始信号,大大提高灵敏度,浓度变化对信号值的影响被放大,大大提高两点之间线性斜率,更容易检出更低浓度的被检物。

[0014] 所述检测试剂盒的其它常规辅助试例如底物、稀释液以及具体操方式均为现有技术,这里不作详细描述。所述固相载体为一切可以吸附或者藕联小分子-载体藕联物的材料(如聚苯乙烯,玻璃表面,免疫磁珠,琼脂糖凝胶,硝酸纤维素膜,聚偏二氟乙烯膜等等),可以以不同的外观形式出现。所述小分子-载体藕联物的载体并不特别限定,本领域技术人员可根据实验的需要进行常规选择,如牛血清白蛋白,鸡卵清蛋白或者血蓝蛋白等,所述包被方法可以采用碳酸盐、磷酸盐包被法或 Tris 包被法等各种包被方法,可根据具体的小分子物质性质和固相材料本身性质作优选,商品化的固相载体参照说明书步骤操作。所述多聚标记物为标记用酶或荧光素或其他标记物,所述标记用酶可以选用如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶等,若多聚标记物采用标记用酶,则检测时就需要使用到底物,底物的选择是参照酶的选择对应的底物;所述荧光素可选用异硫氰酸荧光素(FITC)或异硫氰酸罗丹明(TRITC)等,所述荧光标记物在特定波长激发下可以产生荧光,不需要底物。除了以上所述,方法中没有其他特别的工艺条件或制备工艺,关于温度、浓度、或缓冲液等与常规免疫实验相同。

[0015] 有益效果：

[0016] 1、本发明试剂盒将小分子-载体藕联物直接包被固相载体，同时对标记物复合物（酶标物）进行了特殊处理得到单价抗体-多聚标记物复合物，制备工艺简单、可靠性高、成本低、便于批量生产。

[0017] 2、使用本发明试剂盒进行检测，操作方法简便、待测样品或者小分子标准品加入后与固定化的小分子-载体藕联物同步，再加入作为标记物复合物的单价抗体-多聚标记物复合物，游离小分子（待测样品或标准品）与固定化的小分子-载体藕联物同步竞争与单价抗体-多聚标记物复合物反应，既避免了人工操作前后顺序带来的误差问题，同时采用多聚标记技术，放大原始信号，大大提高灵敏度，浓度变化对信号值的影响被放大，大大提高两点之间线性斜率，更容易捕捉变化微弱信号，更容易检出更低浓度的被检物，提高了竞争法实验的线性曲线的线性系数。使用该技术检测可将信号放大 10-100 倍。

[0018] 3、本发明试剂盒可适用于采用竞争法检测的各种由于分子量小或抗原结合位点少难于用双抗体夹心法检测的分子。

附图说明

[0019] 图 1 为现有试剂盒的原理及检测流程图。

[0020] 图 2 为另一种现有试剂盒的原理及检测流程图。

[0021] 图 3 为使用未单价化抗体-多聚标记物复合物试剂盒的原理及检测流程图。

[0022] 图 4 本发明试剂盒的原理及检测流程图。

[0023] 图 5 为采用本发明试剂盒进行测试和采用 Alpcodiagnosics, 德国拜发公司 (r-biopharm) RIDASCREEN 组胺免疫检测试剂盒利用光值 (OD_{450}) 曲线图比较。

具体实施方式

[0024] 试剂盒制备实施例：

[0025] 本实施例以免疫竞争法检测组胺 ELISA 试剂盒进行叙述，实施例中的组胺为本发明所述的小分子物质，96 孔聚苯乙烯酶标板为本实施例的固相载体。

[0026] 一、固定小分子-载体藕联物的固相载体优选与制备

[0027] 分别采用 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6), 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH7.2), 0.01M Tris-HCl 作为包被缓冲液分别将组胺-牛血清白蛋白藕联物从 10ug/mL 作倍比稀释, 100 μ L/孔, 包被于 96 孔酶标板中, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 拍干板孔中的液体, 1% BSA-TBS (8.5), 150 μ L/孔, 室温封闭 4 小时; 用 TBS/Tween-20 (0.05%) 洗板后, 兔抗组胺-卵清白蛋白血清 1 : 5,000 稀释后, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟; 用 TBS/Tween-20 (0.05%) 洗板后, 将辣根过氧化物酶-羊抗兔溶液 (1 : 1,000, 武汉伊艾特科技股份有限公司生产), 100 μ L/孔加入, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟后, TBS/Tween-20 (0.05%) 洗板 3 次后, 加入即用型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 显色液 (Sigma), 室温反应 10 分钟, 每孔加 100 μ L 终止液 (2M H_2SO_4) 终止反应, 通过酶标仪读取 450nm 吸光值 (OD_{450}), 比较不同的包被方法的 OD_{450} 高低, 线性曲线和背景, 选取相同实验条件下, OD_{450} 较高, 线性曲线相关系数和背景低的包被溶液组进行后续条件筛选。

[0028] 最优包被溶液组进行分析, 以浓度为横坐标, OD_{450} 为纵坐标, 绘制浓度-吸光值曲

线,将相邻两点用直线连接计算其斜率,斜率最小的两点中的浓度较大的抗原浓度确定为最佳包被浓度。

[0029] 根据以上优选结果得到最佳条件包被 ELISA 板,1% BSA-TBS(8.5),150 μ L/孔,室温封闭 4 小时后拍干,密封保存即为制备好的固定小分子-载体藕联物的固相载体。

[0030] 二、标准品及各种稀释液的制备

[0031] 1. 组胺标准品及检测范围的确定

[0032] 按照上述 1 中确定的抗原包被浓度包被酶标板,1% BSA-TBS(8.5) 封闭后按照实施例 2 确定的最佳试用抗血清浓度与包被板 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入稳定剂以后真空密封后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0033] 将标准品从 128ppm 倍比稀释,50 μ L/孔加入酶标孔,然后迅速在每个酶标孔加入 50 μ L 组胺-牛血清白蛋白-多聚酶藕联物工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟,即用型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 显色液 (Sigma),室温反应 10 分钟,每孔加 100 μ L 终止液 (2M H_2SO_4) 终止反应,通过酶标仪读取 450nm 吸光值 (OD_{450})。

[0034] 根据数值绘制浓度-吸光值曲线,确定标准品浓度范围 (0.1-73ppm) 和最低检测限度 (0.05ppm)。

[0035] 2. 小分子标准品分装

[0036] 将组胺标准样品分装成 200ng/支,冻干密封,-20 $^{\circ}$ C 保存;使用之前用样品/标准品稀释液倍比稀释。

[0037] 3. 待测样品/标准品稀释液准备

[0038] 样品/标准品稀释液:90% 0.01M TBS(7.5),10% FBS(胎牛血清,冻存,用前融化),0.01%的硫柳汞。

[0039] 三、单价抗体-多聚标记物的制备

[0040] 1、抗体单价化 (Fab 片段化) 及 Fab 片段亲和层析纯化

[0041] (1) 抗体单价化处理:10 毫克抗体与 0.1 毫克的木瓜蛋白酶混合,37 $^{\circ}$ C 消化 4 小时;(单价抗体也可使用单链抗体,单链抗体制备可按照沈关心主编的《现代免疫学实验技术》2002 年第 2 版 66 页方法进行;)

[0042] (2) 偶联抗 Fab 片段抗体到 Sepharose 4B(GE Healthcare),将抗 Fab 片段抗体按照 Sepharose 4B 产品使用说明进行藕联,藕联抗体量为 10mg/ml Sepharose 4B,装柱;

[0043] (3) 用足量 50mmol/L PBS(7.2) 缓冲液平衡上述亲和层析柱;

[0044] (4) 加入 (1) 中木瓜蛋白酶消化好的抗体片断混合液于柱中,反复循环 30min 至 1 小时;

[0045] (5) 加足量 50mmol/L PBS(7.2) 洗去非特异性吸附蛋白;

[0046] (6) 加入洗脱液 (100mmol/L pH 值 2.7 的甘氨酸盐酸缓冲液) 洗脱结合的 Fab 片段蛋白,每管收集 1ml;

[0047] (7) 于收集管中加入 50-80 μ l 1mo l/L pH 值 9.0 的 TrisHCl 缓冲液中和洗脱下来的溶液,置于 4 $^{\circ}$ C 待测定蛋白含量。

[0048] (8) 将含有蛋白高峰管合并,加入 Amicon 浓缩柱,进行离心浓缩。

[0049] (9) 对纯化浓缩后的 Fab 片段蛋白 10-20 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳检测纯化,如果仅在 25kDa 左右有条带表明已经得到纯化的单价抗体。

[0050] 2、多聚标记物的制备

[0051] 选取合适的多聚载体按照活性键摩尔比与酶标记,标记方法按照各个产品操作说明进行,以下列举出 5 种多聚标记物的制备方法:

[0052] 多聚标记物制备例(1):辣根过氧化物酶(HRP)-多聚赖氨酸多聚复合物的制备

[0053] (1)8mg 辣根过氧化物酶放入 1ml 玻璃瓶,加入 1ml 双蒸水溶解,液体呈棕色;

[0054] (2) 放入一个磁力搅拌子,电磁搅拌同时逐滴缓缓加入新配制的 NaIO_4 0.2ml,室温下继续搅拌 40min,液体呈现草绿色;

[0055] (3) 将全部溶液用滴管装入反复用去离子水冲洗的透析袋中,4℃对 1mM pH 4.4 的 NaAc 透析过夜,中间换液 3-4 次,每次 300ml,溶液最终呈浅棕色;

[0056] (4) 按照酶:赖氨酸载体游离氨基 = 1 : 1 的比例准备多聚赖氨酸,浓度不小于 2mg/ml,对 0.01M Na_2CO_3 透析过夜,中间换液 3-4 次;

[0057] (5) 将透析好的 HRP 溶液(浅棕色)装入玻璃瓶,加入 0.2M Na_2CO_3 溶液将 pH 调整至 9.60,混匀后立即加入透析好的多聚赖氨酸溶液,边加边用电磁搅拌器搅拌;

[0058] (6) 用 0.2M Na_2CO_3 溶液将 HRP/多聚赖氨酸混合物的 pH 调整至 9.0(9-10 之间就可以),室温继续搅拌 3 小时;

[0059] (7) 加入新配制的硼氢化钠溶液 100ul,4℃放置 2 小时;

[0060] (8)4℃,1×PBS 中充分透析,每 2 小时换液一次,共换 4 次后制得。

[0061] 多聚标记物制备例(2):碱性磷酸酶(AP)-多聚赖氨酸多聚复合物的制备

[0062] 将碱性磷酸酶和多聚赖氨酸混合,再加入终浓度 1% (质量百分数)的戊二醛,使酶和多聚赖氨酸的 $-\text{NH}_2$ 分别与两个醛基结合,制备成结合物。

[0063] 其方法如下:

[0064] (1) 将 5mg AP 加入 1ml 相同氨基摩尔数的多聚赖氨酸溶液(不小于 2mg/ml)中溶解,装入透析袋,于 4℃对 0.01mol/L PH7.2PBS 透析 18 小时,换液三次;(2) 加入 2.5%戊二醛 20ul,室温作用 12 小时,4℃对 PBS 透析过夜,其间换液三次;

[0065] (3) 换用 0.05mol/L Tris-HCl(8.0) 缓冲液透析,4℃过夜,换液三次;

[0066] (4) 取出标记备用。

[0067] 多聚标记物制备例(3):异硫氰酸荧光素(FITC)-多聚赖氨酸多聚复合物的制备

[0068] (1) 将待交联的多聚赖氨酸溶液(浓度 $\geq 1\text{mg/ml}$)对交联反应液透析三次 4℃,至 pH = 9.0;(交联反应液配制方法:7.56g NaHCO_3 ,1.06g Na_2CO_3 ,7.36g NaCl ,加水定容至 1L)

[0069] (2) 将 FITC 溶于 DMSO 中,浓度为 1mg/ml。每次交联使用的 FITC 均应新鲜配制,避光;

[0070] (3) 按多聚赖氨酸游离氨基:FITC 摩尔比 = 1 : 1 的比例将 FITC 缓慢加入于多聚赖氨酸溶液中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,暗处 4℃反应 8 小时;

[0071] (4) 加入 5mol/L 的 NH_4Cl 至终浓度 50mmol/L,4℃终止反应 2 小时;

[0072] (5) 将交联物在 PBS 中透析四次以上,至透析液清亮;

[0073] (6)FITC 交联的多聚赖氨酸应置于 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中制得。

[0074] 多聚标记物制备例(4):异硫氰酸罗丹明(TRI TC)-多聚赖氨酸多聚复合物的制备

[0075] 异硫氰酸罗丹明 (TRITC)-多聚赖氨酸多聚复合物的制备方法与上述制备例 (3) 异硫氰酸荧光素 (FITC) 同。

[0076] 多聚标记物制备例 (5): 聚糖类载体-酶标记物制备

[0077] (1) 10mg 聚糖 (葡聚糖, 聚糖或者淀粉等) 放入 1ml 玻璃瓶, 加入 1ml 双蒸水溶解;

[0078] (2) 放入一个磁力搅拌子, 电磁搅拌同时逐滴缓缓加入新配制的 NaIO_4 0.5ml, 室温下继续搅拌 40min;

[0079] (3) 将全部溶液用滴管装入反复用去离子水冲洗的透析袋中, 4°C 对 1mM pH 4.4 的 NaAc 透析过夜, 中间换液 3-4 次, 每次 300ml;

[0080] (4) 加入 0.2M Na_2CO_3 溶液将 pH 调整至 9.60, 将过量的辣根过氧化物酶或者碱性磷酸酶加入, 边加边用电磁搅拌器搅拌;

[0081] (5) 葡聚糖凝胶层析分离未结合的辣根过氧化物酶 / 碱性磷酸酶。

[0082] 3、单价抗体-多聚标记物复合物的制备

[0083] 将步骤 2 中多聚标记物制备例中的的多聚标记物分别和步骤 1 的单价化抗体按照摩尔比 1:1 比例混合, 再加入终浓度 1% (质量百分数) 戊二醛制备单价抗体-多聚标记物复合物。制备方法同多聚标记物制备例 (2) 中碱性磷酸酶 (AP)-多聚赖氨酸多聚复合物的制备, 得到标记物复合物。

[0084] 4. 确定单价抗体-多聚标记物复合物的工作浓度

[0085] 将由一制备的固定了组胺-小分子藕联物的固相载体作为材料, 将单价抗体-多聚标记物复合物从 1:500 开始作纵向倍比稀释, $100\ \mu\text{L}$ /孔, 每个稀释度 8 孔, 37°C 孵育 55 分钟后, TBS/Tween-20 (0.05%) 洗板 4 次后, 加入即用型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 显色液 (Sigma), 室温反应 10 分钟, 每孔加 $100\ \mu\text{L}$ 终止液 ($2\text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$) 终止反应, 通过酶标仪读取 450nm 吸光值 (OD_{450})。

[0086] 以单价抗体-多聚标记物复合物浓度为横坐标, OD_{450} 为纵坐标, 绘制浓度-吸光值曲线, 将相邻两点用直线连接计算其斜率, OD_{450} 值最高且与紧临较小浓度对应 OD_{450} 比值 < 1.5 , 确定为最佳使用浓度。

[0087] 5. 单价抗体-多聚标记物稀释缓冲液的准备

[0088] 单价抗体-多聚标记物制备成 $100\times$ 浓缩液, 用前稀释。

[0089] 单价抗体-多聚标记物稀释缓冲液: 0.01M TBS (7.5) 含 1% 的小牛血清, 0.1% 的明胶, 0.01% 的 PMSF (苯甲基磺酰氟), 0.01% 的硫柳汞。

[0090] 四、底物, 底物显色终止液准备及各种缓冲液准备

[0091] 根据标记物的不同准备对应的商品化的底物显色液, 辣根过氧化物酶的对应底物为即用型 TMB 显色液 (Sigma), 显色终止液为 $2\text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液; 碱性磷酸酶底物为对硝基苯磷酸盐 (p-nitrophenyl-phosphate, pNPP), 可选用商品化的对硝基苯磷酸盐显色液 (Sigma), 显色终止液为 0.5mol/L 碳酸钠。

[0092] 荧光标记物不需要底物, 通过一定波长激发即可产生荧光记录信号, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 纯品为黄色或橙色, 激发光波长为 360nm, 发射光波长为 450nm; 异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 最大吸收光谱 550nm, 激发产生的荧光波长为 620nm, 呈橙红色。

[0093] 五、试剂盒组装

[0094] 根据试剂盒的规格或者待检物 / 标记物特征, 根据每个组件所需量, 将一至五制

备的组份装配试剂盒,以下为试剂盒各组分:

- [0095] 1. 包被小分子-载体藕联物的固相载体
- [0096] 2. 标准品/样品稀释液
- [0097] 3. 标准品 2 瓶(200ng/支)
- [0098] 4. 单价抗体-多聚标记物复合物稀释液
- [0099] 5. 单价抗体-多聚标记物复合物(100×浓缩液)(本实施例中多聚标记物采用多聚标记物制备例(1)中的辣根过氧化物酶(HRP)-多聚赖氨酸多聚复合物),使用前用单价抗体-多聚标记物复合物稀释液稀释 100 倍即为单价抗体-多聚标记物复合物工作液
- [0100] 6. 底物溶液(Sigma)
- [0101] 7. 洗涤液(25×浓缩液):使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
- [0102] 8. 终止液。
- [0103] 本法生产的组胺免疫竞争 ELISA 检测试剂盒检测(使用)方法实施例:
- [0104] 使用前,请提前配置好所有试剂,试剂或样品稀释时,均需混匀,混匀时尽量避免起泡。如样品浓度过高时,用样品稀释液进行稀释,以使样品符合试剂盒的检测范围。标准品从 72ppm 依次作连续 3 倍稀释 7 个稀释度。
- [0105] 1. 加样:分别设空白孔、标准孔、待检样品孔。空白孔加标准品/样品稀释液 50 μl,余孔加待检样品 50 μl,同时每孔加单价抗体-多聚标记物复合物工作液 50 μl(注意不要有气泡,加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁)。
- [0106] 2. 轻轻晃动混匀,酶标板加上盖或覆膜,37℃反应 55 分钟。
- [0107] 3. 温育后,弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,每次浸泡 1-2 分钟,300 μl/每孔,甩干。
- [0108] 4. 依序每孔加底物溶液 100 μl,37℃避光显色(30 分钟内,此时肉眼可见孔内有明显蓝色,即可终止)。
- [0109] 5. 依序每孔加终止溶液 100 μl,终止反应(此时蓝色立转黄色)。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性,底物反应时间到后应尽快加入终止液。
- [0110] 6. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值)。在加终止液后 15 分钟以内进行检测。
- [0111] 7. 计算
- [0112] 以组胺标准物的浓度为横坐标(对数坐标),OD 值为纵坐标(普通坐标),通过专业软件(如 Curve Expert 1.3)绘出标准曲线,得到回归方程,根据待检样品的 OD 值由回归方程计算出相应的浓度,再乘以稀释倍数即为样品的实际浓度。
- [0113] 本法生产的组胺竞争免疫检测试剂盒与同类产品性能比较
- [0114] 按照以上实施例操作方法将标准品从 72ppm 依次作 3 倍稀释,分别比较本试剂盒与其它公司同类产品比较,比较内容:检测范围,灵敏度(最低检测限度),交叉反应,结果见下表(ppm 单位为质量百分数):
- [0115]

性能比较		本法生产的 试剂盒	Alpco Diagnostics	德国拜发 (r-biopharm) RIDA SCREEN
检测范围 (ppm)		0.1-73	0.3-30	0.2-50
最低检 测(ppm)	红葡萄酒	0.05ppm	1.0ppm	0.25ppm
	汽酒	0.05ppm	0.5ppm	0.25ppm
	牛奶	0.1ppm	0.5ppm	0.1ppm
	酸奶、凝乳、 奶酪、鱼	1.0ppm	2.5ppm	2.5ppm
交叉 反应	组氨酸	100%	100%	100%
	3-甲基-组 胺酸	0.01 %	0.1%	0.01 %
	酪胺	无	0.01%	无
	苯丙氨酸	无	无	无
	L-组氨酸	无	无	无
	色氨酸	无	无	无
	5-羟基-3- 吲哚乙酸	无	无	无
血清素	无	无	无	

[0116] 本法试剂盒与 Alpco Diagnostics, 德国拜发公司 (r-biopharm) RIDASCREEN 浓度-吸光值 (OD_{450}) 曲线图比较见图 4。

[0117] 本发明中的竞争免疫试剂盒使用方法除了以上叙述的检测流程顺序外, 其他的具体操作与现有的各种免疫检测产品操作相同, 本文不作赘述。

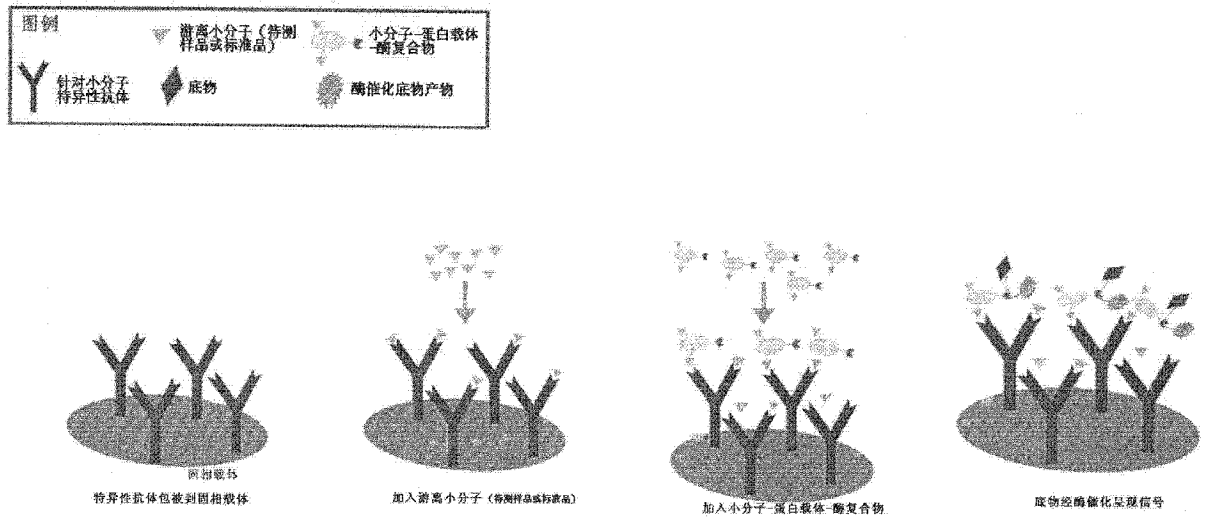


图 1

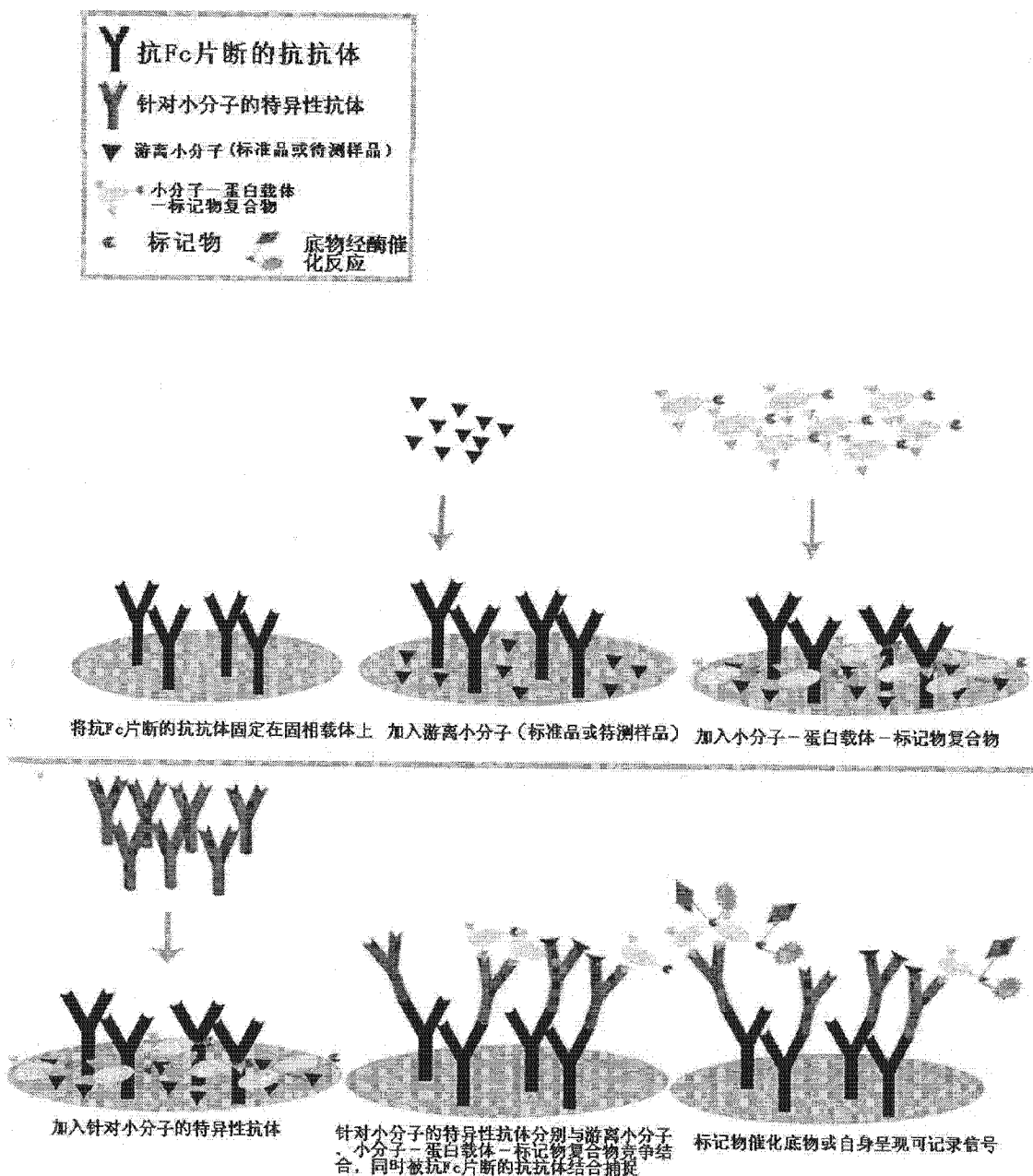


图 2

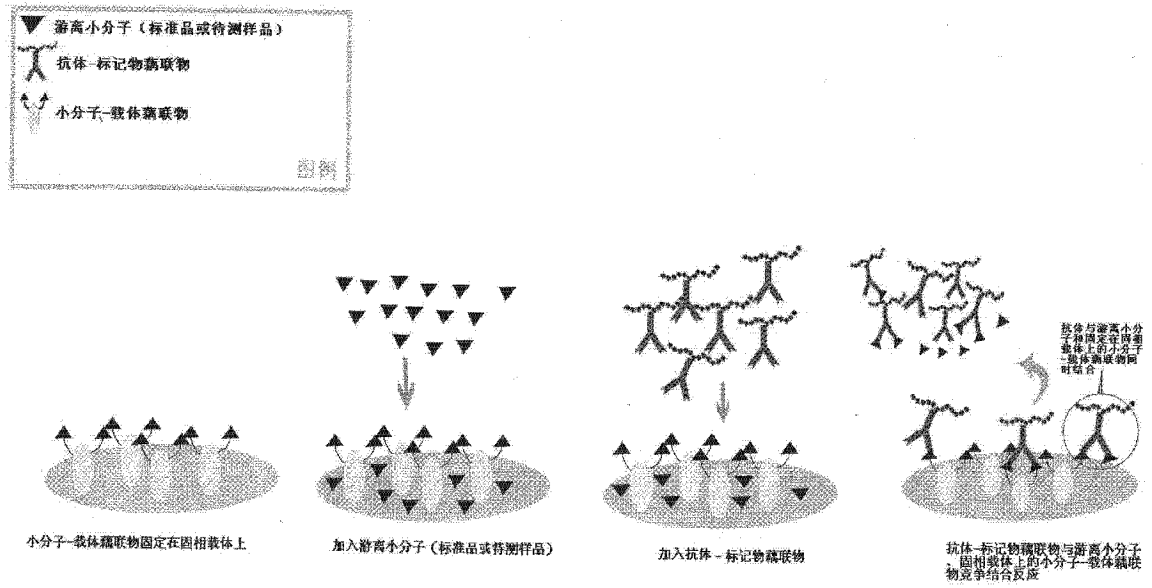


图 3

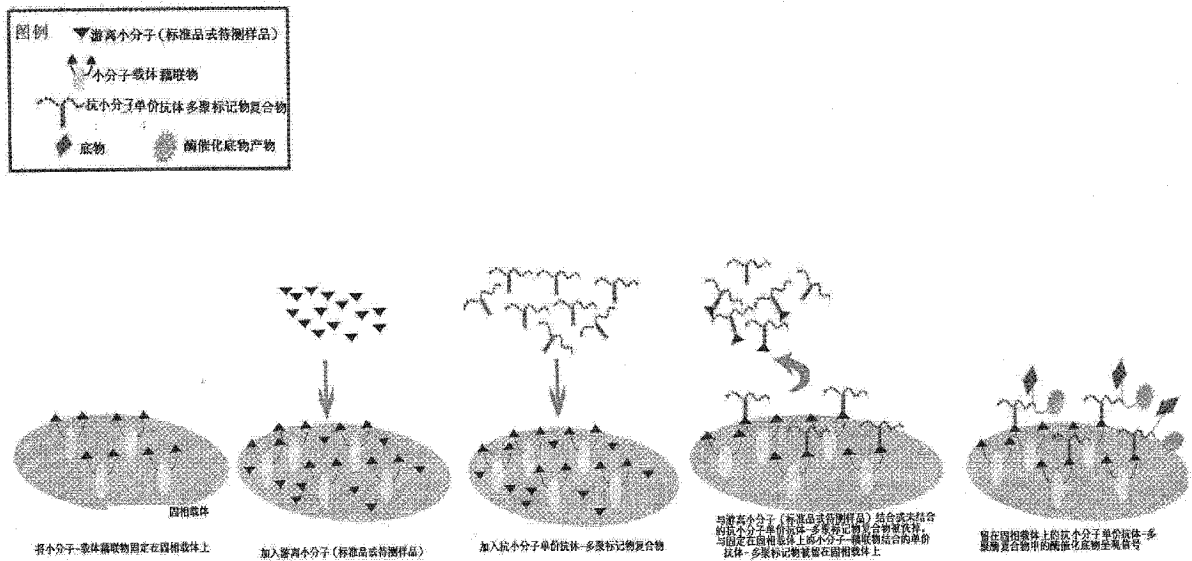


图 4

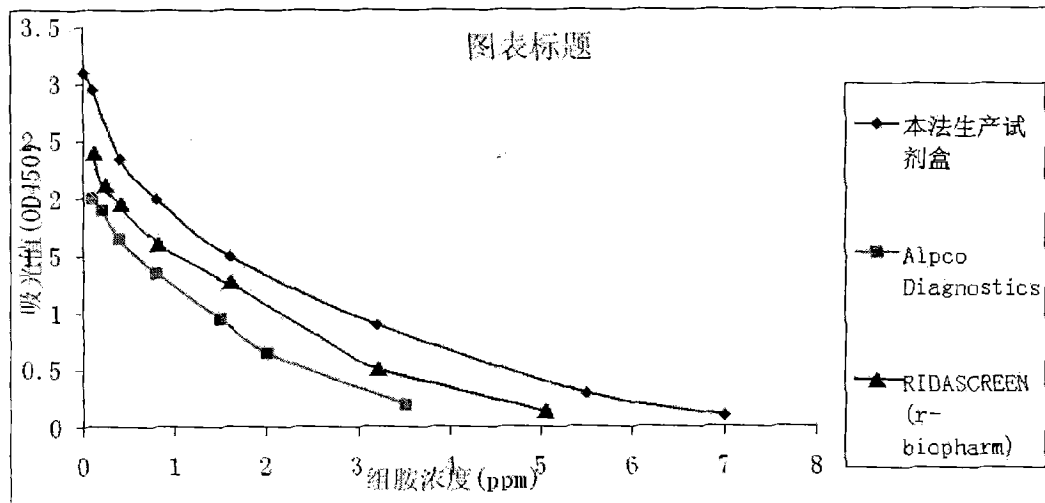


图 5

专利名称(译)	抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测试剂盒及其使用方法和应用		
公开(公告)号	CN101825628A	公开(公告)日	2010-09-08
申请号	CN201010163062.6	申请日	2010-05-04
[标]发明人	费小战 齐兵玉 王凯 李学斌		
发明人	费小战 齐兵玉 王凯 李学斌		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	涂洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗体单价化多聚标记法生产的竞争免疫检测小分子的试剂盒及其使用方法和应用，解决了目前试剂盒制备工艺复杂、使用竞争法检测小分子存在人为误差、测量准确性差、灵敏度低的问题。试剂盒包括固相载体、小分子标准品、标记物复合物，所述固相载体为固定有小分子-载体藕联物的固相载体，所述标记物复合物为单价抗体-多聚标记物复合物。本发明工艺采用抗体单价化多聚标记技术，放大了原始信号，大大提高灵敏度，浓度变化对信号值的影响被放大，大大提高两点之间线性斜率，更容易检出更低浓度的被检物。