



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106053785 A

(43)申请公布日 2016. 10. 26

(21)申请号 201610325806.7

(22)申请日 2016.05.18

(71)申请人 北京北方生物技术研究所有限公司

地址 100076 北京市丰台区潘家庙甲20号

(72)发明人 郑嘉庚 秦伟涛 潘国华 谷泽亮

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

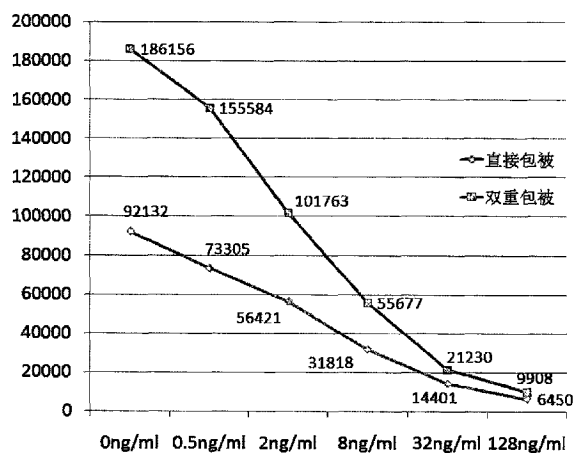
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种用于竞争法化学发光免疫反应的固相抗体预包被方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于竞争法化学发光免疫反应的预包被固相抗体的方法。本发明用包被缓冲液将羊抗兔等第二抗体配制成合适浓度，加入96孔不透明微孔板中进行物理吸附，完成后可弃去液体；再用封闭缓冲液稀释抗体，加入微孔板中进行双重包被，最后弃去液体并干燥，得到固相抗体包被板。该制备方法与单纯包被抗体或第二抗体相比，具有抗体利用率提高，包被板活性增强的特点，可以提升预包被板的性能指标。



1. 一种制备竞争法化学发光免疫反应预包被固相抗体的方法,其特征在于:包括以下步骤:以碳酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲液为包被缓冲液,将第二抗体用包被缓冲液稀释至浓度为 $1.0\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$,加入96孔不透明微孔板中,孵育后弃去孔中液体,再用含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液作为封闭缓冲液,将抗体用封闭缓冲液稀释至合适的浓度,加入微孔板中,孵育后弃去孔中液体。最后干燥密封后进行保存。

2. 根据权利要求1所述的竞争法化学发光免疫反应,指以96孔不透明微孔板为分离介质,辣根过氧化物酶标记抗原为示踪方法,酶催化鲁米诺产生发光,标记抗原与待测抗原竞争结合抗体的免疫反应,一般用于小分子抗原浓度的测定。

3. 根据权利要求1所述的第二抗体,其特征在于:当抗体为羊抗体、兔抗体或鼠抗体时,相应的第二抗体分别为抗羊IgG、抗兔IgG或抗鼠IgG。

4. 根据权利要求1所述的孵育,其特征在于:加入液体体积为 $100\mu\text{l}\sim 200\mu\text{l}$,在温度为 $2\sim 37^{\circ}\text{C}$ 条件下,静置时间为 $2\sim 72$ 小时。

5. 根据权利要求1所述的96孔不透明微孔板,其材质为聚苯乙烯,可以为白色或黑色不透明,每板有96个微孔,可以分拆。

6. 根据权利要求1所述的包被缓冲液为碳酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲液,PH为 $7.0\sim 9.6$,浓度为 $0.01\sim 0.05\text{M}$,封闭缓冲液为磷酸盐缓冲液,PH为 $7.0\sim 7.5$,浓度为 $0.01\sim 0.05\text{M}$,含牛血清白蛋白 $0\sim 2\%$,新生牛血清 $0\sim 10\%$,蔗糖 $0\sim 20\%$,海藻糖 $0\sim 5\%$ 。

一种用于竞争法化学发光免疫反应的固相抗体预包被方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外免疫检测技术领域,特别涉及一种采取第二抗体与抗体双重包被制备预包被板的方法与应用。

背景技术

[0002] 免疫反应一般需要一种标记方案,一种分离方案。96孔微孔板上预包被固相抗体是一种常规、经济、方便的分离方案。96孔微孔板用于化学发光试验时,一般以辣根酶催化鲁米诺发光最为常用。96孔微孔板材质为聚苯乙烯,其包被蛋白有两种具体的操作办法,一种是直接物理吸附,即通过疏水作用将IgG分子吸附于聚苯乙烯材质上,包括将IgG分子进行疏水预处理。第二种是共价结合,通过引入氨基、羧基等通过共价反应将IgG结合在聚苯乙烯板上,目的是提高吸附量。目前商品化的试剂以第一种为主。直接物理除了包被抗体外,还有一种变通思路就是制备通用性预包被板如第二抗体板、亲和素板、荧光素抗体板等,在免疫反应时将抗体作为一种反应组份加入,这样可以实现统一的预包被板,从而节约研发周期及成本等。但同时采取第二抗体与抗体进行双重包被则未见报道。

[0003] 化学发光免疫反应测定有多个免疫决定簇的分子时,一般用夹心法,即用包被抗体与标记抗体来识别抗原的两个决定簇,最后形成的三明治的固相抗体-抗原-标记抗体结合物。抗原浓度与最终的发光强度呈正相关。化学发光免疫反应测定小分子时,一般用竞争法,包括包被抗体+标记抗原的竞争法及包被抗原+标记抗体的竞争法,最终抗原浓度与发光强度呈反相关。竞争法常引入第二抗体如包被二抗+抗体+标记抗原的竞争法以及包被抗原+抗体+标记二抗的竞争法。

[0004] 蛋白质与聚苯乙烯固相载体的物理吸附是非特异性的,包被量除受蛋白质的分子量、等电点、浓度等的影响,还受限于空间位阻,理想情况下抗体的最大吸附量可达300~400ng IgG/cm²。如果将微孔板上先包被第二抗体,一方面,预包被第二抗体后,相当于将平面结构变为立体结构,增加了表面积。同时每个第二抗体分子有两个Fab端,可以结合两个抗体,这样就增加了抗体包被容量。另一方面,抗体的Fc端朝向第二抗体,Fab端暴露在外侧,使得抗体可以更好地参与免疫反应。其它带来的好处还包括抗体无须进行专门纯化,减少纯化过程的损失与损伤,从而节约成本;抗体与第二抗体的亲和力大,反应更完全,导致抗体加入量相应减少,也可以节约成本。

[0005] 双重包被的模式在包被抗体的竞争法上应用是成立的。在夹心法上,固相的第二抗体会对标记抗体产生免疫反应,影响夹心法的反应模式,即便包被与标记采取异源抗体,交叉反应也可以导致灵敏度下降,因此双重包被在夹心法模式上应用是受到限制的。

发明内容

[0006] 本发明的首要目的是为了在竞争法化学发光免疫反应中,提升固相抗体的活性。另一目的,是为了降低抗体纯化的要求,使得多克隆血清、单克隆腹水无须纯化可以直接使用。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是在抗体包被之前增加一次第二抗体的包被,并将抗体包被与封闭结合在一起,以不增加工艺复杂性。具体步骤,包括:

[0008] 1.包被:将第二抗体用包被缓冲液稀释至浓度为 $1.0\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$,加入96孔不透明微孔板中,静置孵育。体积为 $100\mu\text{l}\sim 200\mu\text{l}$,在温度为 $2\sim 37^\circ\text{C}$ 条件下,静置时间为 $2\sim 72$ 小时。

[0009] 2.封闭:弃去孔中液体,用封闭缓冲液将抗体稀释至合适的浓度,加入微孔板中,静置孵育。体积为 $100\mu\text{l}\sim 200\mu\text{l}$,在温度为 $2\sim 37^\circ\text{C}$ 条件下,静置时间为 $2\sim 72$ 小时。

[0010] 3.干燥密封:弃去孔中液体,室温干燥后密封保存。

[0011] 作为优选,包被缓冲液为碳酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲液,pH为 $7.0\sim 9.6$,浓度为 $0.01\sim 0.05\text{M}$ 。

[0012] 作为优选,封闭缓冲液为磷酸盐缓冲液,pH为 $7.0\sim 7.5$,浓度为 $0.01\sim 0.05\text{M}$,含牛血清白蛋白 $0\sim 2\%$,新生牛血清 $0\sim 10\%$,蔗糖 $0\sim 20\%$,海藻糖 $0\sim 5\%$ 。

[0013] 本发明在传统的抗体包被之前增加了一步第二抗体的包被,并将抗体包被与封闭一步进行,最终得到的包被板的活性要明显优于常规的抗体包被板。

[0014] 本发明与现有技术相比的优点是:用廉价的第二抗体先进行一次预包被,最终制得的化学发光固相抗体的活性要明显优于常规包被。并且抗体不需要纯化,减少了抗体纯化带来的损伤与损失,最终可以减少经济成本。

附图说明

[0015] 图1是孕酮两种包被板对比实验图

[0016] 图2是睾酮两种包被板对比实验图

具体实施方式

[0017] 下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明,以下实施例是对本发明的解释而本发明并不局限于以下实施例。

[0018] 实施例1:孕酮单克隆抗体固相抗体预包被板的制备步骤:

[0019] a.包被:将羊抗鼠IgG用 0.02M 磷酸盐缓冲液,pH 7.2 ,稀释至 $10\mu\text{g}/\text{ml}$,按每孔 $100\mu\text{l}$ 加入到微孔中, 4°C 包被24小时。

[0020] b.封闭:弃去包被液,将孕酮单隆抗体用 0.02M 磷酸盐缓冲液,pH 7.2 ,稀释至 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,并加入 1% BSA, 10% 蔗糖。按每孔 $100\mu\text{l}$ 加入到微孔中, 4°C 封闭24小时。

[0021] c.干燥:弃封闭液,拍干,在低湿度($10\sim 30\%$)的室内吹干过夜。铝箔袋密封包装。

[0022] d.对照板(直接包被板):制备方法为:将孕酮单隆抗体用 0.02M 磷酸盐缓冲液,pH 7.2 ,稀释至 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,按每孔 $100\mu\text{l}$ 加入到微孔中, 4°C 包被24小时,弃去包被液,封闭液(0.02M 磷酸盐缓冲液,pH 7.2 , 1% BSA, 10% 蔗糖),按每孔 $100\mu\text{l}$ 加入到微孔中, 4°C 封闭24小时。同样进行干燥,密封包装。

[0023] e.两种包被板进行对比实验,同时带上不同浓度的孕酮校准品,结果如下:

[0024] 表1:孕酮两种包被板发光值(RLU)对比实验结果

[0025]

	0ng/ml	0.5ng/ml	2ng/ml	8ng/ml	32ng/ml	128ng/ml
直接包被 50 μ l 校准品 +50 μ l 酶标抗原	92132	73305	56421	31818	14401	6450
双重包被 50 μ l 校准品 +50 μ l 酶标抗原	186156	155584	101763	55677	21230	9908

[0026] 以发光值(RLU)与浓度(ng/ml)进行logit-log拟合,拟合方程分别为:

[0027] 直接包被: $\ln(\text{结合率}/(1-\text{结合率}))=-1.67\log(\text{浓度})+0.89, r=-0.9994$ [0028] 双重包被: $\ln(\text{结合率}/(1-\text{结合率}))=-1.87\log(\text{浓度})+0.89, r=-0.9962$

[0029] 双重包被的发光值RLU为直接包被的1.78倍,意味着固相抗体的活性或包被量的增加。

[0030] 实施例2:睾酮多克隆抗体预包被板的制备步骤:

[0031] a. 包被:将驴抗兔IgG用0.05M碳酸盐缓冲液,pH9.5,稀释至10 μ g/ml,按每孔100 μ l加入到微孔中,4 $^{\circ}$ C包被24小时。[0032] b. 封闭:弃去包被液,将兔抗睾酮多克隆抗体用0.02M磷酸盐缓冲液,pH7.2,稀释至1:10万,并加入0.5%BSA,5%蔗糖。按每孔100 μ l加入到微孔中,4 $^{\circ}$ C包被24小时。

[0033] c. 干燥:弃包被液,在低湿度(10~30%)的室内吹干过夜。铝箔袋密封包装。

[0034] d. 对照板(固相二抗板):制备方法为:将驴抗兔IgG用0.05M碳酸盐缓冲液,pH9.5,稀释至10 μ g/ml,按每孔100 μ l加入到微孔中,4 $^{\circ}$ C包被24小时,弃去包被液,封闭液(0.02M磷酸盐缓冲液,pH7.2,0.5%BSA,5%蔗糖),按每孔100 μ l加入到微孔中,4 $^{\circ}$ C封闭24小时。同样进行干燥,密封包装。

[0035] e. 两种包被板进行对比实验,同时带上不同浓度的睾酮校准品,结果如下:

[0036] 表2:睾酮两种包被板发光值(RLU)对比实验结果

[0037]

	0ng/ml	0.1ng/ml	0.4ng/ml	1.6ng/ml	6.4ng/ml	25.6ng/ml
固相二抗板 100 μ l 抗体 +50 μ l 酶标抗原 +50 μ l 校准品	52153	50611	41730	26612	14553	6364
双重包被板 100 μ l 稀释液 +50 μ l 酶标抗原 +50 μ l 校准品	182093	142261	85162	40859	15318	6790

[0038] 以发光值(RLU)与浓度(ng/ml)进行logit-log拟合,拟合方程分别为:

[0039] 固相二抗板: $\ln(\text{结合率}/(1-\text{结合率}))=-2.2\log(\text{浓度})+0.85, r=-0.9857$ [0040] 双重包被板: $\ln(\text{结合率}/(1-\text{结合率}))=-1.88\log(\text{浓度})-0.76, r=-0.9968$

[0041] 双重包被的发光值RLU为直接包被的2.0倍,意味着固相抗体的活性或包被量的增加。

[0042] 以上所述实施例是本发明的较佳实施例。本发明的保护范围不限于实施例列举的范围,凡依本发明专利申请范围所述的特征及原理所做的等效变化,均包括在本发明专利申请范围内。

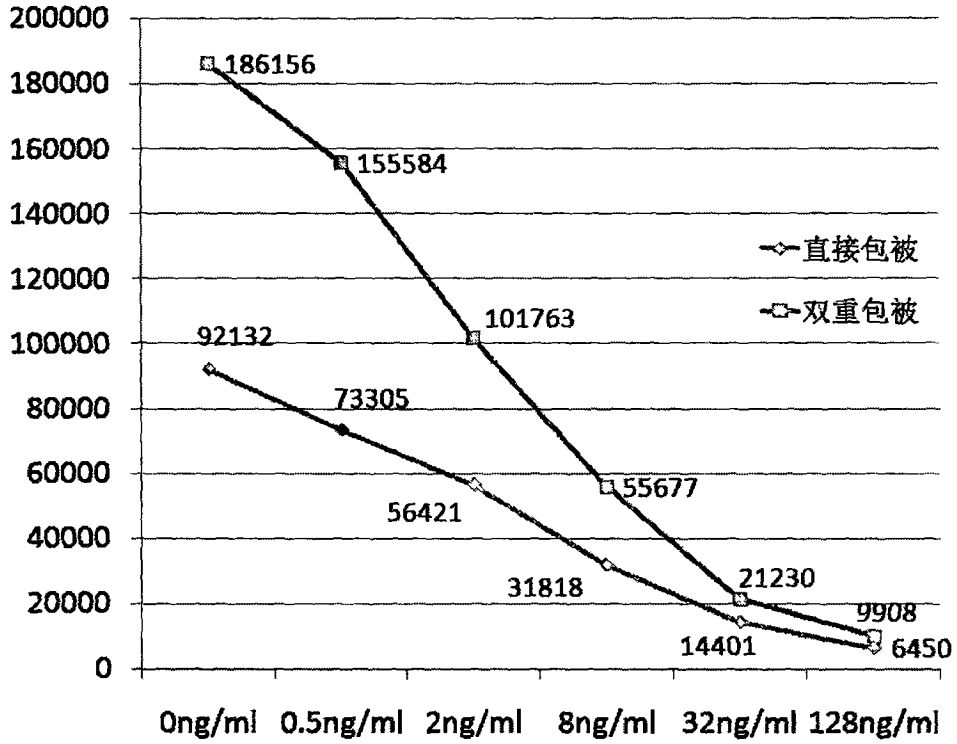


图1

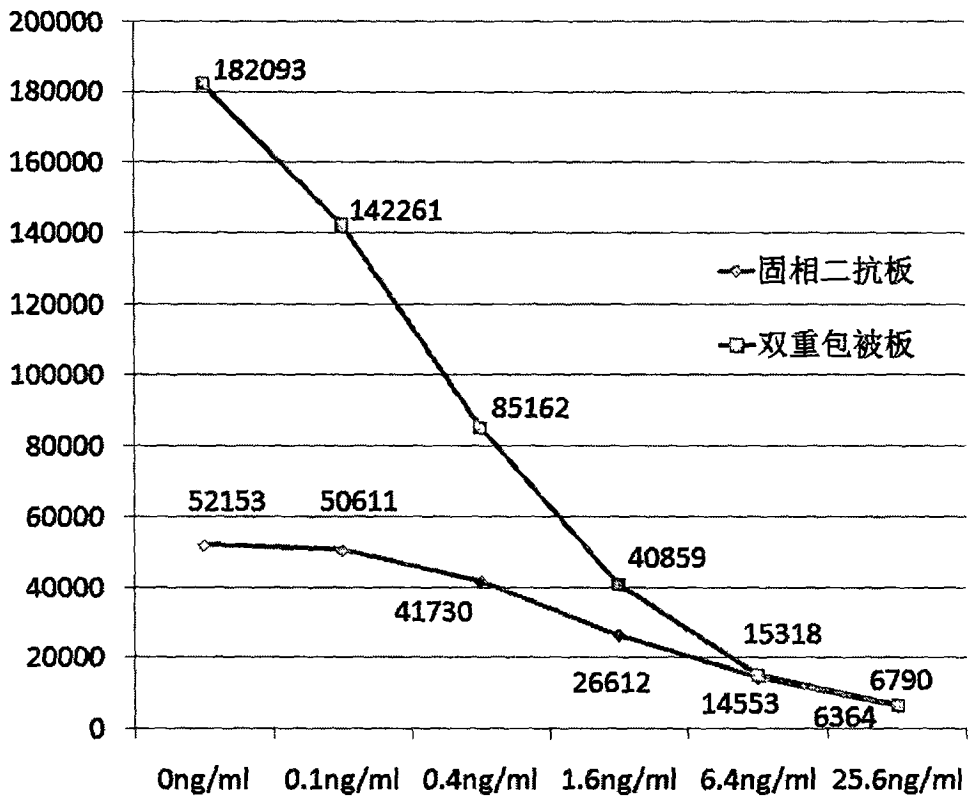


图2

专利名称(译)	一种用于竞争法化学发光免疫反应的固相抗体预包被方法		
公开(公告)号	CN106053785A	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201610325806.7	申请日	2016-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京北方生物技术研究所		
申请(专利权)人(译)	北京北方生物技术研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京北方生物技术研究所有限公司		
[标]发明人	郑嘉庚 秦伟涛 潘国华 谷泽亮		
发明人	郑嘉庚 秦伟涛 潘国华 谷泽亮		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于竞争法化学发光免疫反应的预包被固相抗体的方法。本发明用包被缓冲液将羊抗兔等第二抗体配制成合适浓度，加入96孔不透明微孔板中进行物理吸附，完成后可弃去液体；再用封闭缓冲液稀释抗体，加入微孔板中进行双重包被，最后弃去液体并干燥，得到固相抗体包被板。该制备方法与单纯包被抗体或第二抗体相比，具有抗体利用率提高，包被板活性增强的特点，可以提升预包被板的性能指标。

