



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109342714 B

(45)授权公告日 2020.05.19

(21)申请号 201811123796.4

(22)申请日 2018.09.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109342714 A

(43)申请公布日 2019.02.15

(73)专利权人 南方医科大学
地址 510515 广东省广州市广州大道北
1838号南方医科大学

(72)发明人 李金峰 李婷婷 张玲 黎诚耀

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 廖苑滨

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 1330153 A,2002.01.09,
CN 103674657 A,2014.03.26,
CN 101832999 A,2010.09.15,
CN 103674657 A,2014.03.26,
CN 108490166 A,2018.09.04,
CN 103777006 A,2014.05.07,
CN 102081018 A,2011.06.01,

审查员 李倩

权利要求书1页 说明书3页 附图3页

(54)发明名称

一种抗原抗体免疫复合物解离方法

(57)摘要

本发明涉及医学检测领域,公开了一种抗原抗体免疫复合物解离方法,首先往样品中添加高浓度的氯化钠,置于50~70℃作用一段时间,再添加解离剂对抗原抗体复合物进行解离。采用本发明所提出的抗原抗体复合物解离方案处理相关样品,效果明显优于文献报道的和商品化试剂盒的处理效果。

1. 一种抗原抗体免疫复合物解离方法,其特征在于,首先往样品中添加高浓度的氯化钠,置于45~70℃作用5~20min,其中,所述高浓度的氯化钠是指终浓度在1.5~3M范围内的氯化钠;再添加解离剂对抗原抗体复合物进行解离;所述解离剂中含有5~6 M的尿素、3.0~7.0 %的Tween 80、0.5~3.0 %的Triton X100;其中,所述抗原抗体复合物为HCV感染者血清抗体和HCV-cAg形成的复合物。

2. 如权利要求1所述的抗原抗体免疫复合物解离方法,其特征在于,所述解离剂中尿素的含量为5.5 M,所述Tween 80的含量为5 %,所述Triton X100的含量为1.0 %。

3. 如权利要求1所述的抗原抗体免疫复合物解离方法,其特征在于,所述氯化钠的终浓度为2.5M。

一种抗原抗体免疫复合物解离方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测领域,尤其涉及一种抗原抗体免疫复合物解离方法。

背景技术

[0002] 由于HCV(丙型肝炎病毒)感染者血清抗体会与ELISA反应体系中捕获抗体和检测抗体竞争结合HCV-cAg(人丙肝病毒核心抗原)的抗原表位,降低了HCV-cAg检测的灵敏度,可能导致假阴性。

[0003] 在现有文献报道的方法中,主要采用酸、表面活性剂、蛋白质变性剂、还原剂,以及温度等对抗原-抗体复合物进行解离,在解离的同时破坏抗体的活性,以蛋白质、糖等物质对抗原进行保护,如:溶液(0.3% Triton X-100、1.5% CHAPS、15% SDS),但效果并不理想。

发明内容

[0004] 本发明针对现有检测技术中的以上问题,本发明提供了一种新的解离抗原抗体复合物的方法。

[0005] 一种抗原抗体免疫复合物解离方法,首先往样品中添加高浓度的氯化钠,置于50~70℃作用一段时间,再添加解离剂对抗原抗体复合物进行解离。

[0006] 作为优选的,所述解离剂中含有5~6 M的尿素、3.0~7.0 %的Tween 80、0.5~3.0 %的Triton X100。

[0007] 作为优选的,所述解离剂中尿素的含量为5.5 M,所述Tween 80的含量为5 %,所述Triton X100的含量为1.0 %。

[0008] 作为优选的,所述高浓度的氯化钠是指终浓度在1.5~3M范围内的氯化钠。

[0009] 作为有限的,所述氯化钠的终浓度为2.5M。

[0010] 作为优选的,往样品中添加氯化钠之后,置于45~70℃作用5~20min。

[0011] 本发明的有益效果是,采用本发明所提出的抗原抗体复合物解离方案处理相关样品,效果明显优于文献报道的和商品化试剂盒的处理效果。

附图说明

[0012] 图1 为本发明中尿素浓度对于样品处理效果的影响(0~7M区段)。

[0013] 图2 为本发明中尿素浓度对于样品处理效果的影响(5.0~6.0M区段)。

[0014] 图3 为本发明中表面活性剂、蛋白质浓度对于样品处理效果的影响(已含5.5M尿素)。

[0015] 图4 为本发明中表面活性剂、糖等的浓度对于样品处理效果的影响(已含5.5M尿素、5% Tween 80)。

[0016] 图5 为本发明与现有技术的效果对比。

具体实施方式

[0017] 下面用具体实施例对本发明做进一步详细说明,但本发明不仅局限于以下具体实施例。如无特别说明,本发明文件中所有百分浓度均为重量体积比;M是指摩尔浓度。

[0018] 实施例一 氯化钠对于处理效果的影响。

[0019] 1. 往血清中加入不同浓度的氯化钠,作用一段时间。

[0020] 2. 取处理后的液体,用山东莱博生物科技有限公司的HCV核心抗原检测试剂盒进行检测,同时检测未经氯化钠处理的同一血清样品,比较两种处理方法的差异。结果如表1~3所示。

[0021] 3. 从表中可以看出,经氯化钠处理可以显著提升P/N值,有助于提高阳性检出率。随着氯化钠浓度的增加,P/N值先升高再降低。到2.5M时,达到最高。随着处理温度的升高,P/N值也是先升高再降低,到58℃时达到最高值。随着处理时间的延长,P/N值先增大,等达到平台期之后(15min),基本不再增加。

[0022] 表1 NaCl处理对于结果的影响

[0023] NaCl浓度(M)	0	1.5	2	2.5	3
P/N	5.14	6.79	9.24	15.42	13.99

[0024] 注:P/N指阳性与阴性对照之间的比值。

[0025] 表2 NaCl处理温度对于结果的影响

[0026] 温度(℃)	37	45	58	65	70
P/N	3.25	5.64	13.65	12.45	10.21

[0027] 注:P/N指阳性与阴性对照之间的比值。

[0028] 表2 NaCl处理时间对于结果的影响

[0029] 时间(min)	0	5	10	15	20
P/N	3.78	4.98	9.95	13.54	13.78

[0030] 注:P/N指阳性与阴性对照之间的比值。

[0031] 实施例2 不同解离剂对于解离效果的影响。

[0032] 用自己配制的解离剂代替山东莱博HCV核心抗原检测试剂盒中的解离剂进行HCV核心抗原血清样本检测,以确定最佳解离剂配方。

[0033] 1. 首先对尿素的浓度进行了摸索:用不同浓度的尿素处理血浆样品,比较ELISA P/N值变化情况,确定最佳工作浓度。结果见图1。

[0034] 随着尿素浓度的增加,阴阳性之间的差异也越来越明显。到5M尿素时,P/N值达到最大值。

[0035] 为了进一步确定尿素的工作浓度,比较了5M、5.5M、6M尿素对于样品处理的影响,结果如图2所示。

[0036] 可知5.5M的处理效果要好于5M和6M两个浓度。

[0037] 2. 为进一步考察在5.5M尿素条件下,还能否进一步提高检测信号强度。分别往5.5M尿素中添加不同浓度的DTAB、CHAPS、Triton X 114、Triton X 100、Tween 80、FBS、SDS、Tween 20。其结果如图3所示。

[0038] 可见Tween 80较其他物质会明显提升检测信号。当Tween 80的浓度达到5%时,信

号达到最高(P/N=2.5)。

[0039] 3.为进一步考察在5.5M尿素、5% Tween 80条件下,还能否进一步提高检测信号强度。分别往5.5M尿素、5% Tween 80中添加不同浓度的,其结果如图4所示。

[0040] 发现添加Triton X 100对于检测信号的提升效果最佳:Triton X 100浓度在3.0%时,P/N=4.38最高。

[0041] 分别采用发明制备的处理液(PBS含5.5M尿素、5% Tween 80、1% Triton X100)和文献报道的处理液,以及山东莱博生物科技有限公司HCV核心抗原检测试剂盒中提供的处理液进行实验比较,其结果如图5所示。

[0042] 从图中可以看出,本研究制备的血浆(血清)样品处理液稀释的HCV感染者样品经ELISA检测,其OD450值为0.93(P/N=2.63),优于文献报道的和商品化试剂盒的处理液的样品处理效果。

[0043] 实施例3 本发明所述方案与现有方案对比。

[0044] 分别用本发明公开的方案和文献报道的方案(解离剂为0.3% Triton X-100、1.5% CHAPS、15% SDS),以及商品化试剂盒(山东莱博的HCV核心抗原检测试剂盒)检测HCV血清样本,比较彼此之间的差异。结果如表4所示。从结果来看,本发明方案明显优于现有方案。

[0045] 表4 本发明方案与现有技术方案对比

	本发明方案	文献报道方案	试剂盒
P/N	25.17	14.34	19.87

[0047] 注:P/N指阳性与阴性对照之间的比值。

[0048] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对本发明作其它形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

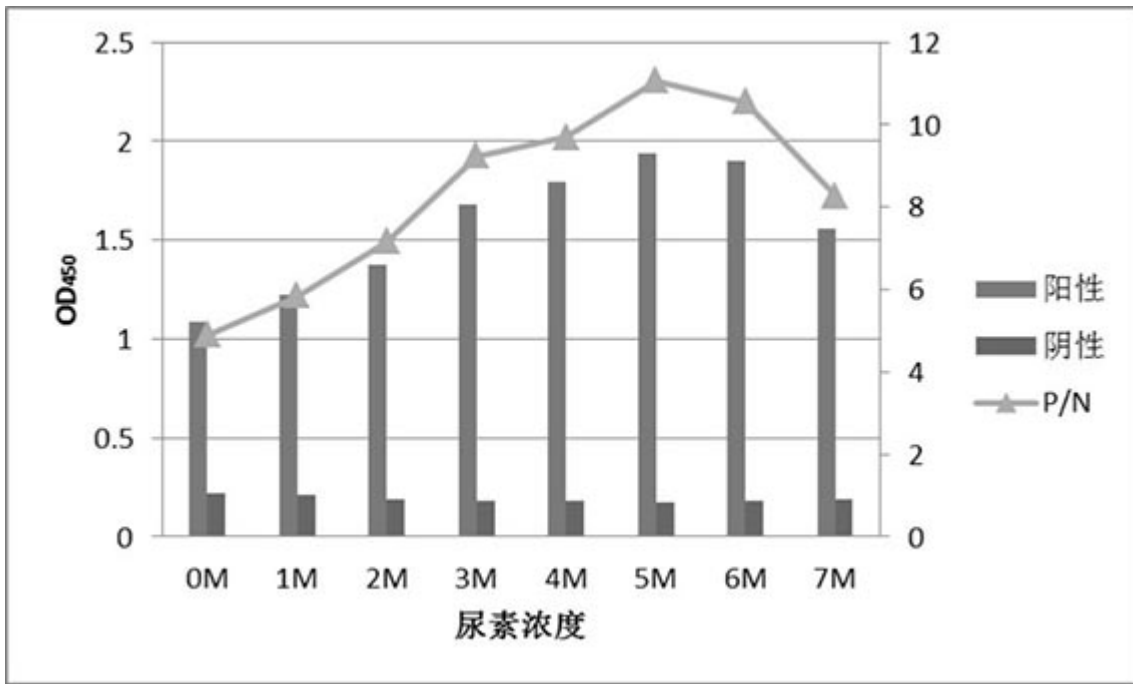


图1

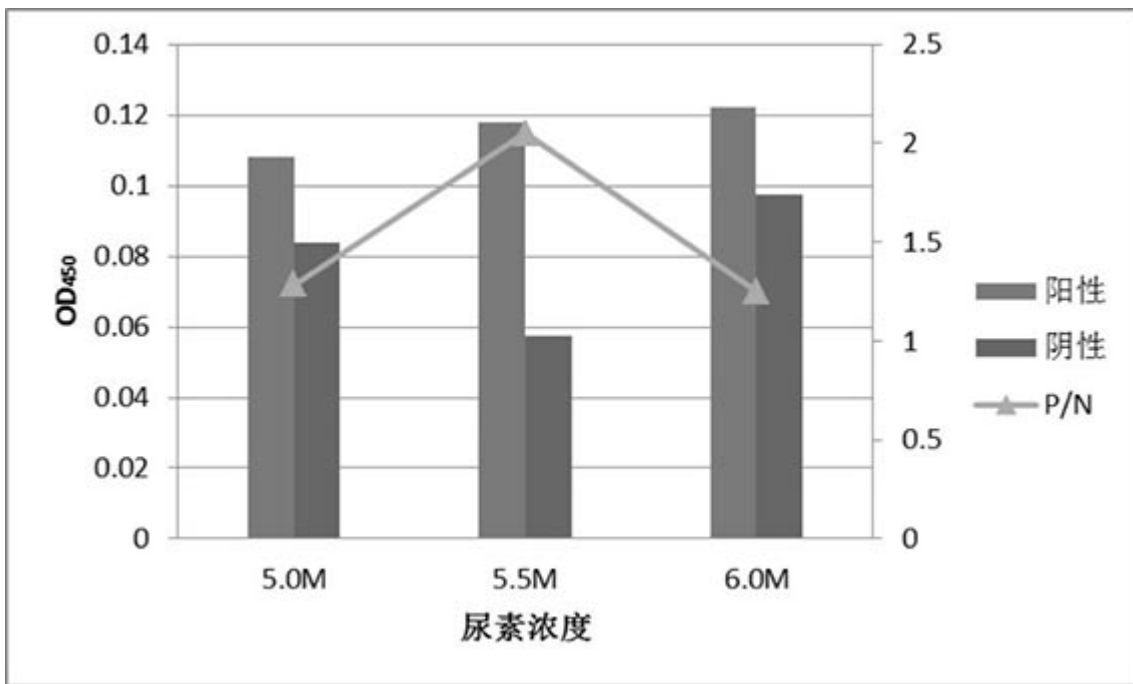


图2

添加剂量	P/N	添加剂量	P/N
对照	0.95	0.5% Tween 80	2.36
1.0% DTAB	0.66	1.0% Tween 80	1.89
1.5% DTAB	0.94	3.0% Tween 80	2.30
2.0% DTAB	1.20	5.0% Tween 80	2.50
2.5% DTAB	1.71	7.0% Tween 80	1.90
0.5% CHAPS	1.61	2.0% FBS	1.30
1.0% CHAPS	1.11	5.0% FBS	1.09
3.0% CHAPS	0.89	10% FBS	0.88
5.0% CHAPS	0.81	20% FBS	0.83
7.0% CHAPS	0.97	30% FBS	0.86
0.5% Triton X 114	1.18	0.5% SDS	0.98
1.0% Triton X 114	0.96	1.0% SDS	1.06
3.0% Triton X 114	1.35	3.0% SDS	0.46
5.0% Triton X 114	1.32	5.0% SDS	0.61
7.0% Triton X 114	1.06	7.0% SDS	0.96
0.5% Triton X 100	0.81	0.5% Tween 20	1.15
1.0% Triton X 100	1.06	1.0% Tween 20	1.16
3.0% Triton X 100	0.92	3.0% Tween 20	1.03
5.0% Triton X 100	0.88	5.0% Tween 20	1.12
7.0% Triton X 100	1.44	7.0% Tween 20	0.95

图3

添加剂量	P/N	添加剂量	P/N
0.5% Tween 20	2.14	0.5% CHAPS	2.33
1.0% Tween 20	2.23	1.0% CHAPS	1.76
3.0% Tween 20	1.79	3.0% CHAPS	1.32
0.5% Tween 20	2.25	3.0%海藻糖	4.63
1.0% Tween 20	1.31	7.0%海藻糖	5.57
3.0% Tween 20	1.13	3.0%蔗糖	3.44
0.5% Triton X 114	2.21	7.0%蔗糖	5.4
1.0% Triton X 114	3.06	0.5% DTAB	1.1
3.0% Triton X 114	2.39	1.0% DTAB	0.94
0.5% Triton X 100	4.08	3.0% DTAB	0.99
1.0% Triton X 100	4.28	1.0% BSA	3.86
3.0% Triton X 100	4.38	对照	4.09

图4

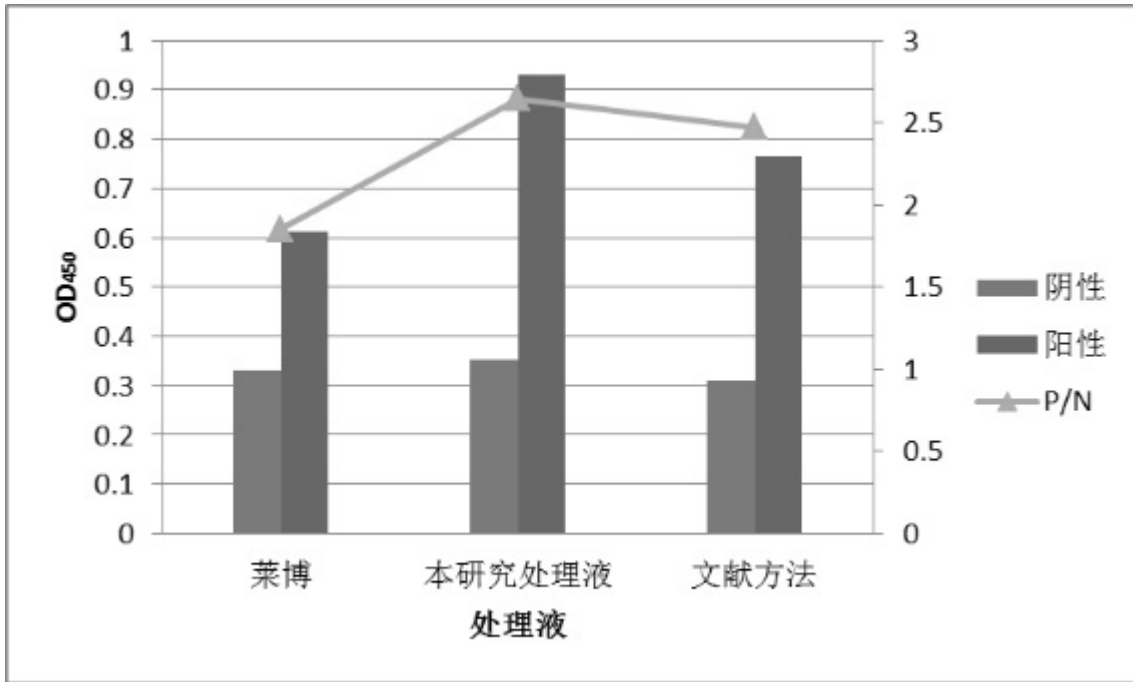


图5

专利名称(译)	一种抗原抗体免疫复合物解离方法		
公开(公告)号	CN109342714B	公开(公告)日	2020-05-19
申请号	CN201811123796.4	申请日	2018-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	李金峰 李婷婷 张玲 黎诚耀		
发明人	李金峰 李婷婷 张玲 黎诚耀		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN109342714A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学检测领域，公开了一种抗原抗体免疫复合物解离方法，首先往样品中添加高浓度的氯化钠，置于50~70°C作用一段时间，再添加解离剂对抗原抗体复合物进行解离。采用本发明所提出的抗原抗体复合物解离方案处理相关样品，效果明显优于文献报道的和商品化试剂盒的处理效果。

