



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101833000 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

(21) 申请号 201010171203.9

(22) 申请日 2010.05.13

(71) 申请人 北京海瑞祥天生物科技有限公司
地址 100195 北京市海淀区闵庄路3号玉泉
慧谷27栋

(72) 发明人 李纪阳

(74) 专利代理机构 北京方韬法业专利代理事务
所 11303

代理人 逄俊臣

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

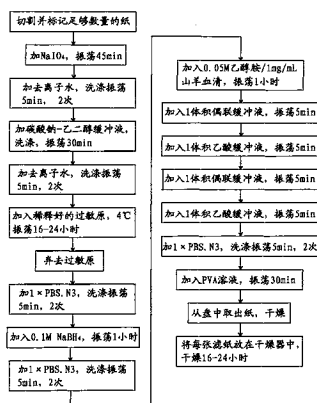
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

高效级联放大的抗体检测法

(57) 摘要

本发明是有关于一种高效级联放大的抗体检测法,其是采用酶联免疫吸附法,包括以下步骤:包被处理步骤,即将已知抗原或抗体吸附在固相载体表面;加入酶标记的特异性二抗,使抗原抗体反应在固相载体表面进行;用洗涤法将液相中的游离成分洗除;其中,所述的包被处理步骤中使用高纯度免疫血清作为封闭剂。本发明在现有的ELISA的基础上进行了进一步改进,提高了抗原-抗体的反应信号,降低了本底信号,有效放大的样品中待测物质的信号,从而能够用来检测生物样品中的低量甚至痕量物质。



1. 一种高效级联放大的抗体检测法,其是采用酶联免疫吸附法,包括以下步骤:
包被处理步骤,即将已知抗原或抗体吸附在固相载体表面;
加入酶标记的特异性二抗,使抗原抗体反应在固相载体表面进行;
用洗涤法将液相中的游离成分洗除;
其特征在于:
所述的包被处理步骤中使用高纯度免疫血清作为封闭剂。
2. 根据权利要求 1 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的高纯度免疫血清的获得包括:对供血动物饲养以及血清制备过程的无菌监控。
3. 根据权利要求 1 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的包被处理步骤,具体包括固相载体的化学处理步骤以及经处理后的固相载体与已知抗原或抗体的偶联步骤。
4. 根据权利要求 3 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的固相载体的化学处理步骤依次包括:NaIO₄ 氧化处理、碳酸钠-乙二醇缓冲液洗涤、NaBH₄ 还原处理、磷酸缓冲液洗涤、动物血清封闭、偶联缓冲液洗涤以及 PVA 溶液洗涤,其中,动物血清封闭处理即是使用高纯度免疫血清作为封闭剂。
5. 根据权利要求 1 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的二抗为采用杂交瘤获得的单克隆抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的单克隆抗体为鼠抗人单克隆抗体。
7. 根据权利要求 1 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的已知抗原或抗体依次经过透析、中空纤维过滤制得。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的固相载体为滤纸。
9. 根据权利要求 8 所述的高效级联放大的抗体检测法,其特征在于所述的固相载体为 Whatman 541 滤纸。

高效级联放大的抗体检测法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种诊断免疫分析技术领域,特别是涉及一种高效级联放大的抗体检测法。

背景技术

[0002] 检测生物样品中的低量甚至痕量物质,是体外诊断试剂的具有挑战性的任务之一。一般来说,对于样品中的较高含量的抗原物质,比如说孕妇尿中 hCG 或血清中的特异性 IgG,常规的检测方法为酶联免疫吸附法(ELISA)或该方法基础上的类似变形方法(比如免疫印迹法)。然而,当检测低量或是痕量的抗原物质时,常规 ELISA 一般会存在信号低,本底高,检测结果不稳定的问题,从而使结果呈现阴性或弱阳性,因而对临床诊断的应用意义不大。

[0003] 由此可见,上述现有的抗体检测法在低量或痕量检测的应用上,显然仍存在有不便与缺陷,而亟待加以进一步改进。如何能创设一种可提高抗原-抗体反应信号,降低本底信号,有效放大的样品中待测物质的信号,从而能够用来检测生物样品中的低量甚至痕量物质的新的高效级联放大的抗体检测法,实属当前的重要研究课题之一。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种高效级联放大的抗体检测法,使其可提高抗原-抗体反应信号,降低本底信号,有效放大的样品中待测物质的信号,从而能够用来检测生物样品中的低量甚至痕量物质,从而克服现有的抗体检测法的不足。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明一种高效级联放大的抗体检测法,其是采用酶联免疫吸附法,包括以下步骤:包被处理步骤,即将已知抗原或抗体吸附在固相载体表面;加入酶标记的特异性二抗,使抗原抗体反应在固相载体表面进行;用洗涤法将液相中的游离成分洗除;其中,所述的包被处理步骤中使用高纯度免疫血清作为封闭剂。

[0006] 作为本发明的一种改进,所述的高纯度免疫血清的获得包括:对供血动物饲养以及血清制备过程的无菌监控。

[0007] 所述的包被处理步骤,具体包括固相载体的化学处理步骤以及经处理后的固相载体与已知抗原或抗体的偶联步骤。

[0008] 所述的固相载体的化学处理步骤依次包括:NaIO₄ 氧化处理、碳酸钠-乙二醇缓冲液洗涤、NaBH₄ 还原处理、磷酸缓冲液洗涤、动物血清封闭、偶联缓冲液洗涤以及 PVA 溶液洗涤,其中,动物血清封闭处理即是使用高纯度免疫血清作为封闭剂。

[0009] 所述的二抗为采用杂交瘤获得的单克隆抗体。

[0010] 所述的单克隆抗体为鼠抗人单克隆抗体。

[0011] 所述的已知抗原或抗体依次经过透析、中空纤维过滤制得。

[0012] 所述的固相载体为滤纸。

[0013] 所述的固相载体为 Whatman 541 滤纸。

[0014] 采用这样的设计后,本发明在现有的 ELISA 的基础上进行了进一步改进,提高了抗原-抗体的反应信号,降低了本底信号,有效放大的样品中待测物质的信号,从而能够用来检测生物样品中的低量甚至痕量物质。

附图说明

[0015] 上述仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,以下结合附图与具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0016] 图 1 是本发明高效级联放大的抗体检测法的包被处理流程示意图。

具体实施方式

[0017] 常规的酶联免疫吸附法 (ELISA) 及其类似方法,主要包括:包被处理步骤,即将已知抗原或抗体吸附在固相载体表面;加入酶标记的特异性二抗,使抗原抗体反应在固相载体表面进行;用洗涤法将液相中的游离成分洗除。

[0018] 本发明高效级联放大的抗体检测法,是采用了上述酶联免疫吸附法,并在包被处理步骤中使用高纯度免疫血清作为封闭剂。

[0019] 较佳的,上述包被处理步骤,可具体包括固相载体,例如 Whatman 541 滤纸的化学处理步骤以及经处理后的固相载体与已知抗原或抗体的偶联步骤。其中,已知抗原或抗体是购买的抗原提取物或人血清白蛋白(阴性对照),并依次经过透析、中空纤维过滤制得。化学处理步骤可如图 1 所示,依次包括:NaIO₄ 氧化处理、碳酸钠-乙二醇缓冲液洗涤、NaBH₄ 还原处理、磷酸缓冲液洗涤、动物血清封闭、偶联缓冲液洗涤以及 PVA 溶液洗涤,彻底洗去没有偶联上的抗原,再经干燥后即可制成测试条。其中,动物血清封闭处理即是使用高纯度免疫血清作为封闭剂的步骤。对固相载体进行特殊的化学处理,保护了抗原提取物表面的抗原决定簇,使得抗原在包被后仍能保持较高的活性,提高抗原-抗体反应的信号。

[0020] 高纯度免疫血清的获得包括:对供血动物饲养以及血清制备过程的无菌监控,例如选用健康、饮食监控、可溯源的山羊作为供血动物,且血清在全程无菌条件下制备。封闭剂的使用是降低本底、杂质和假阳性信号的关键,ELISA 中的包被步骤中需要使用封闭剂,由于封闭剂的使用量很大,而且作为封闭剂的首选物质血清和血清白蛋白都是极容易带有杂质(动物体内的多种免疫反应产生的本底抗体等)的物质,并且封闭剂极少的杂质都会引发本底信号。发明人经过大量研究实验发现,将供血动物在良好的放养环境、饮食、健康条件下饲养,并对血清的制备、储存、检测严格监控,会很大程度上降低异常免疫反应的几率,能够获得高纯净度、低 IgE 含量的封闭剂。

[0021] 以山羊为例来具体说明高纯度免疫血清的制备:

[0022] 1、提供血清的山羊为专门供血之用,不做其他用途,并在专门的设施内饲养,不与其他用途的动物混养,不与不同品种的动物混养;

[0023] 2、供血动物要处于良好的健康状态,要确保取血后的恢复期,保留个体病例,保留取血溯源记录,饲养设施要宽敞整洁,避免焦虑、压力、恐惧等可能产生异常免疫应激的事件;

[0024] 3、供血动物的食物和水来源清楚,不含抗生素,不含动物蛋白,不含激素,避免食品添加剂,如果有添加剂,要有清楚备案;

[0025] 4、取血和血清制备采用全程无菌操作，血清的制备必须在取血当天（12 小时内）完成，血清的去纤维化在 2-8℃ 和冷冻离心机内完成，之后马上冷藏或冷冻；

[0026] 5、血清要经过进一步的纯化，包括用活性炭吸附法去除荷尔蒙、用高温灭活法去除病毒和蛋白酶、以及用双层过滤法去除细菌和霉菌，双层过滤法使用 0.22μm 的常规滤膜 0.22μm 的医药级滤膜；

[0027] 6、血清要有严格的成品质检，要求不含细菌、霉菌或支原体，内毒素和血红蛋白的水平要在规定范围内；

[0028] 7、血清要有清晰的溯源性，可以溯源到个体的动物，每个批号的血清都要进行总 IgE 和特异性 IgE 的筛查，以血清 IgE 含量最低的动物的血清做为提供高纯封闭剂的首选。

[0029] 此外，本发明所使用的二抗采用杂交瘤获得的单克隆抗体，优选鼠抗人单克隆抗体。ELISA 中的酶标记的特异性二抗是抗原-抗体反应信号放大的最关键有效的一步，同时也是很容易引发假阳性的一步。发明人经过大量研究实验发现，在本发明的技术方案中采用杂交瘤技术获得的单克隆抗体，与常规的单或多克隆抗体相比具有更强的特异性和亲和力，降低信噪比，防止假阳性的出现。

[0030] 以下具体说明本发明中二抗的一种制备过程：

[0031] 1、细胞克隆和重复克隆

[0032] CAF1 鼠腹腔被注射纯化的人 IgE，并按 1-2 周的间隔促进。血清中抗 IgE 抗体的效价被定期监测，通过检测血清稀释液结合放射性标记的 IgE 的能力来确定。当鼠体内产生的抗 IgE 抗体的效价足够的时候，鼠脾在无菌条件下被摘除，分离成单细胞，与 SP2/0 细胞融合，产生杂交瘤细胞。

[0033] 杂交瘤细胞被转到 96 微孔板上，并用选择性培养基（HAT 培养基）培养。存活的杂交瘤细胞被筛选，按产生具有期望特征的抗体的能力。具有产生高效价和 IgE 亚基特异性抗体能力的杂交瘤细胞的选择通过竞争放射免疫分析法进行。

[0034] 为了保证所有细胞系的溯源性，建立种子批系统，监测杂交瘤的可行性和抗体的特异性和活性。感兴趣的细胞系被冷冻，储存在液氮罐中。为了避免细胞系的意外损失，每个细胞系，都在液氮罐中储存了多个样品。

[0035] 亚克隆细胞储备从液氮罐储存的复苏。这些细胞被培养到足够的密度，能生产 50 瓶的量。这 50 瓶被定为主要储备，储存在液氮罐中，形成主要的种子批。解冻主要种子批中的 3 瓶，进行培养，测试抗体效价，符合生产要求的能力。

[0036] 如果主种子批满足生产要求，一瓶将被用于生产工作种子批，种子批用于腹水生产。当冷冻种子批剩下 10 瓶时，从主种子批取出 1 瓶，进行复制。

[0037] 2、抗体生产

[0038] 工作种子批细胞被重新培养，腹部注射到小鼠体内。细胞在体内生长，直到鼠表现应激的临床信号，此时，鼠通过颈椎脱臼处理，用异丙醇消毒皮肤，打开腹腔，无菌收集腹水。

[0039] 腹水在 1200rpm 离心，收集包含抗体的上清液，储存以便进一步加工。杂交瘤细胞粒被重新悬浮，再注射到小鼠体内。这个步骤被重复，直到 4 个阶段被完成。收集的含抗体的上清液被脱脂，然后用等体积的饱和硫酸铵沉淀。沉淀用磷酸缓冲液重新悬浮，通过离子交换柱纯化。纯化的抗体的浓度被确定通过 280nm 的吸光值，用于定量特性和应用。

[0040] 抗体要达到如下特征：

[0041] (1) 亲和性： $1.45 \times 10^9 M^{-1}$

[0042] (2) 特异性：与 IgG、IgM 和 IgA 的交叉反应 $\leq 0.1\%$ 。

[0043] (3) 腹水抗体浓度：3-5mg/mL

[0044] 3、过敏原特异性 IgE 抗体的检测

[0045] 将过敏原按上述方法进行包被，制成测试条。

[0046] 将上述制备的鼠抗人 IgE 单克隆抗体与碱性磷酸酶 (ALP) 偶联，制成酶标记的抗体。将此抗体溶于 pH 8.4 的硼酸缓冲液，同时加 0.1% 的脱脂奶粉，4℃ 搅拌 12 小时后使用。此溶液为结合液。

[0047] 底物采用 5-溴-4-氯-3-吲哚 (BCIP)，溶于 2-氨基-2-甲基-1-丙醇，避光溶解。

[0048] 检测步骤：

[0049] 在小试管中加入 1mL 待测血清；

[0050] 将试管放入恒温水浴 25℃ 中；

[0051] 将条子加入血清中，开始记时；

[0052] 30 分钟后，流动的自来水冲洗条子 55 秒；

[0053] 31 分钟时将条子加入结合液；

[0054] 61 分钟时，流动的自来水冲洗条子 55 秒；

[0055] 62 分钟时，将条子加入底物溶液；

[0056] 92 分钟时，取出条子，吸干。

[0057] 结果：包被有过敏原的纸垫的颜色如果出现蓝色，则可判断为阳性；包被有过敏原的纸垫的颜色如果是白色，则判断为阴性。

[0058] 4、牛奶过敏原特异性 IgE 抗体的检测

[0059] 按照上述方法进行牛奶过敏原包被、配制结合液和底物液。

[0060] 收集临床经法玛西亚 Unicap 系统检测过的阳性血清 10 份，牛奶过敏原特异性 IgE 抗体含量在 0.7-3.5IU/mL 之间，。

[0061] 使用上述制备好的测试条、结合液和底物液检测收集的 10 份血清，检测结果均为阳性。

[0062] 使用 2mol/L 氯化钙溶液稀释上述血清，使血清中牛奶过敏原特异性 IgE 抗体含量分别为 0.25IU/mL、0.30IU/mL、0.35IU/mL、0.40IU/mL、0.45IU/mL。

[0063] 按上述方法分别对稀释后的血清进行检测。检测结果表明，本方法的检测的临界值为血清中 IgE 抗体含量达到 0.35IU/mL。

[0064]

编号	血清中 IgE 抗体含量	检测结果
1	0.25IU/mL	-
2	0.30IU/mL	-

编号	血清中 IgE 抗体含量	检测结果
3	0.35IU/mL	+
4	0.40IU/mL	+
5	0.45IU/mL	+

[0065]

[0066] 注 :+ 为阳性结果, - 为阴性结果。

[0067] 本发明高效级联放大的抗体检测法,提出了对抗体信号进行分步骤的逐级放大的概念,利用一系列的提高信号、降低本底的手段,使得检测 IgE 抗体的效率总体提高,从而进一步扩大 ELISA 检测法的适用范围。

[0068] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,本领域技术人员利用上述揭示的技术内容做出些许简单修改、等同变化或修饰,均落在本发明的保护范围内。

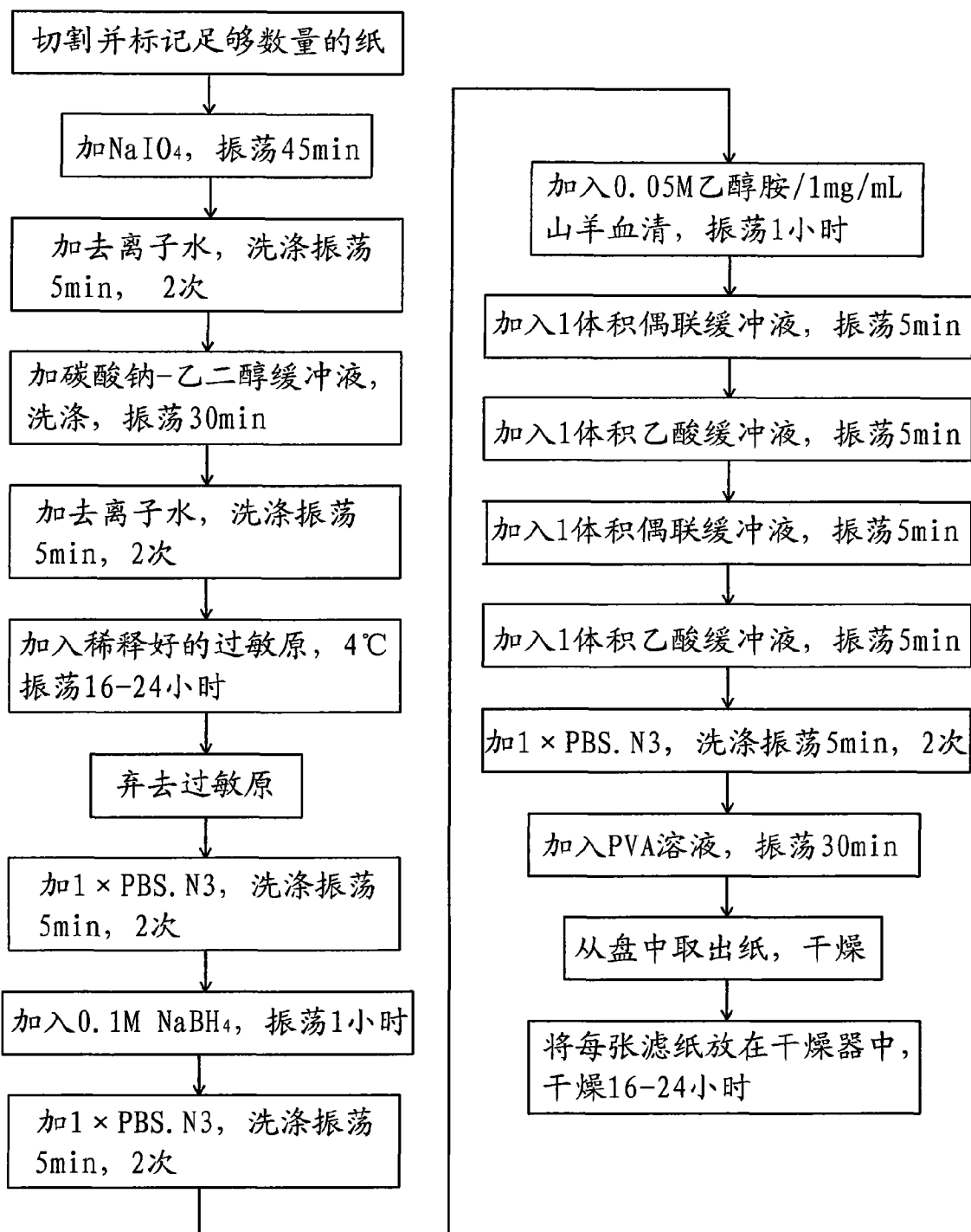


图 1

专利名称(译)	高效级联放大的抗体检测法		
公开(公告)号	CN101833000A	公开(公告)日	2010-09-15
申请号	CN201010171203.9	申请日	2010-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京海瑞祥天生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京海瑞祥天生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京海瑞祥天生物科技有限公司		
[标]发明人	李纪阳		
发明人	李纪阳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是有关于一种高效级联放大的抗体检测法，其是采用酶联免疫吸附法，包括以下步骤：包被处理步骤，即将已知抗原或抗体吸附在固相载体表面；加入酶标记的特异性二抗，使抗原抗体反应在固相载体表面进行；用洗涤法将液相中的游离成分洗除；其中，所述的包被处理步骤中使用高纯度免疫血清作为封闭剂。本发明在现有的ELISA的基础上进行了进一步改进，提高了抗原-抗体的反应信号，降低了本底信号，有效放大的样品中待测物质的信号，从而能够用来检测生物样品中的低量甚至痕量物质。

