

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102213724 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 201010145084. X

(22) 申请日 2010. 04. 09

(71) 申请人 中国科学院电子学研究所

地址 100190 北京市海淀区北四环西路 19 号

(72) 发明人 刘儒平 蔡新霞 刘军涛 刘春秀
罗金平 王蜜霞

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 周长兴

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

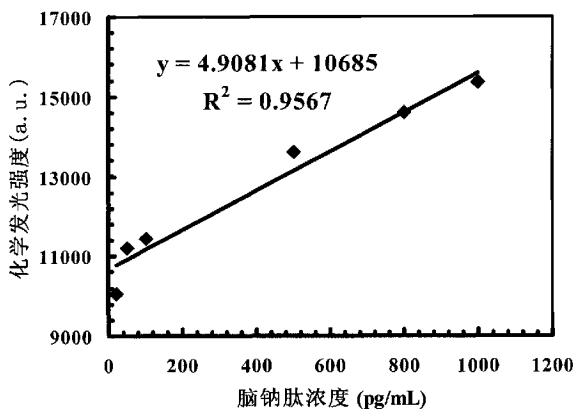
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法, 主要步骤为 :1) 待测蛋白与酶标抗体的反应形成免疫复合物 ;2) 抗体修饰的磁性微纳粒子与上述免疫复合物反应, 形成双抗体夹心复合物 ;3) 在磁场中对双抗体夹心复合物洗涤, 去除多余酶标抗体。本发明不仅操作简单, 所用试剂量少, 成本低廉, 适合心肌标志物类、内分泌激素类、肿瘤标志物类等蛋白的快速检测。



1. 一种基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法,主要步骤为:
 - 1) 待测蛋白与酶标抗体的反应形成免疫复合物;
 - 2) 抗体修饰的磁性微纳粒子与上述免疫复合物反应,形成双抗体夹心复合物;
 - 3) 在磁场中对双抗体夹心复合物洗涤,去除多余酶标抗体。
2. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,所述酶标抗体中的酶是辣根过氧化酶或碱性磷酸酶。
3. 根据权利要求2所述的检测方法,其中,所述辣根过氧化酶对应的底物体系为鲁米诺(3-氨基邻苯二甲酰肼)或其衍生物过氧化氢发光体系,在425nm时探测其光信号;
碱性磷酸酶对应的底物体系是1,2-二氧杂环丁烷类底物体系,在470nm时探测其光信号。
4. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,所述步骤1和步骤2的反应均于37℃恒温中进行,步骤1的反应时间是10~25分钟,步骤2的反应时间是3~8分钟。
5. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,所述磁性微纳粒子为铁磁性超顺磁材料中的一种或几种组合而成。
6. 根据权利要求1或5所述的检测方法,其中,所述磁性微纳粒子的粒径在10nm~3000nm。
7. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,所述待测蛋白的体积是30~60 μ L,酶标抗体的体积是30~60 μ L,所需生物功能化的磁性微纳粒子的体积是10~50 μ L。
8. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,所述对双抗体夹心复合物洗涤的缓冲液组成为:8-10mM的磷酸盐缓冲液,pH=7.4,体积百分含量为0.02-0.05%的吐温-20。

一种基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,是一种采用化学发光法并适于产业化的蛋白快速检测技术,具体地涉及一种痕量蛋白快速检测的方法。

背景技术

[0002] 痕量蛋白的检测对疾病的早期诊断,早期治疗有重要的参考价值 and 临床意义。目前,已出现多种检测痕量蛋白的方法,如化学发光法、放射免疫法、试条半定量法等。其中推出的化学发光酶免疫法检测因具有快速、准确、重复性好、安全无毒等优点,受到临床和实验室的关注。但目前的化学发光酶免疫检测痕量蛋白法主要依赖于大型进口化学发光仪和检测试剂,缺点是仪器与试剂成本高,给患者带来的经济负担相对较重。如,较为常用的 Biosite 公司检测脑钠肽 (BNP) 需样品量为 250 μ L,其测试线性相关系数 $R = 0.950$ 。

发明内容

[0003] 本发明的目的就是提供一种痕量蛋白快速检测方法,该方法操作简单,成本低廉,耗样量少,检测速度快,适合痕量蛋白的快速检测。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供的基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法,主要步骤为:

[0005] 1) 待测蛋白与酶标抗体的反应形成免疫复合物;

[0006] 2) 抗体修饰的磁性微纳粒子与上述免疫复合物的反应,形成双抗体夹心复合物;

[0007] 3) 在磁场中对双抗体夹心复合物洗涤,去除多余酶标抗体。

[0008] 所述的检测方法中,酶标抗体中的酶是辣根过氧化酶或碱性磷酸酶。

[0009] 所述的检测方法中,辣根过氧化酶对应的底物体系为鲁米诺 (3-氨基邻苯二甲酰肼) 或其衍生物过氧化氢发光体系,在 425nm 时探测其光信号;

[0010] 碱性磷酸酶对应的底物体系是 1,2- 二氧杂环丁烷类底物体系,在 470nm 时探测其光信号。

[0011] 所述的检测方法中,步骤 1 和步骤 2 的反应均于 37 $^{\circ}$ C 恒温中进行,步骤 1 的反应时间是 10 ~ 25 分钟,步骤 2 的反应时间是 3 ~ 8 分钟。

[0012] 所述的检测方法中,磁性微纳粒子为铁磁性超顺磁材料中的一种或几种组合而成。磁性微纳粒子的粒径在 10nm ~ 3000nm。

[0013] 所述的检测方法中,待测蛋白的体积是 30 ~ 60 μ L,酶标抗体的体积是 30 ~ 60 μ L,所需生物功能化的磁性微纳粒子的体积是 10 ~ 50 μ L。

[0014] 所述的检测方法中,对双抗体夹心复合物洗涤的缓冲液组成为:8-10mM 的磷酸盐缓冲液 (PBS), pH = 7.4, 体积百分含量为 0.02-0.05% 的吐温 -20 (Tween-20)。

[0015] 本发明提供的检测方法需要的样品量小于公知技术,对脑钠肽检测的相关系数 $R = 0.978$,需要的样本量大大减少,线性相关性较高。本发明不仅操作简单,所用试剂量少,成本低廉,适合心肌标志物类、内分泌激素类、肿瘤标志物类等蛋白的快速检测。本发明采

用磁性微纳技术与化学发光免疫分析技术相结合,提供了一种通用性强、成本相对较低的痕量蛋白快速检测平台,具有重要的现实意义。

附图说明

[0016] 图 1 为本发明实施例的检测标准曲线。

具体实施方式

[0017] 本发明包括两步反应和一步洗涤。

[0018] 第一步反应为待测蛋白与酶标抗体的反应,该反应于 37℃ 恒温中形成免疫复合物,孵育时间为 10 ~ 25min,优选 15min。其中所需待测蛋白的体积是 30 ~ 60 μ L,优选 50 μ L,所需酶标抗体的体积是 30 ~ 60 μ L,优选 50 μ L。

[0019] 第二步反应为抗体修饰的磁性微纳粒子与上述免疫复合物的反应,形成双抗体夹心复合物。该反应在 37℃ 恒温中孵育时间需要 3 ~ 8min,优选 5min。所需生物功能化的磁性微纳粒子的体积是 10 ~ 50 μ L,优选 30 μ L。

[0020] 一步洗涤为在磁场中用缓冲液 (8-10mM PBS, pH = 7.4, 0.02-0.05% Tween-20) 对该双抗体夹心复合物洗涤 3 ~ 5 次,去除多余酶标抗体。

[0021] 本发明的酶标抗体中的酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (ALP) 中的一种,其中辣根过氧化物酶对应的底物体系为鲁米诺 (3-氨基邻苯二甲酰肼) 或其衍生物过氧化氢发光体系。碱性磷酸酶对应的底物体系是 1,2- 二氧杂环丁烷类 (AMPPD) 底物体系。

[0022] 加入底物进行测定时,根据测定的发光信号进行定量分析,发光强度与待测蛋白浓度成比例,利用公知的化学发光检测仪可定量检测待测蛋白。

[0023] 对于辣根过氧化物酶及底物发光体系,在 425nm 时探测其光信号。对于碱性磷酸酶及底物发光体系,在 470nm 时探测其光信号。上述两步反应均于 37℃ 孵育,第一步反应所需要的孵育时间是 10 ~ 25min,第二反应孵育时间需要 3 ~ 8min。

[0024] 本发明的磁性微纳粒子由铁磁性超顺磁材料中的一种或几种组合而成。其粒径在 10nm ~ 3000nm。

[0025] 本发明所用的待测蛋白的体积是 30 ~ 60 μ L,酶标抗体的体积是 30 ~ 60 μ L,所需生物功能化的磁性微纳粒子的体积是 10 ~ 50 μ L。

[0026] 下面结合具体实施例对本发明进行描述:

[0027] 实施例 1

[0028] 取 50 μ L 待测 BNP 标准品溶液与 50 μ L 辣根过氧化物酶标记 BNP 抗体溶液 (原液浓度 1.2mg/mL,按 1 : 10000 稀释) 混合,置于 37℃ 孵育 15 分钟 (min),然后加入 30 μ L 表面修饰 BNP 抗体的生物功能化的磁粒子,孵育 5min,形成免疫夹心复合物,然后置于磁分离器上,用缓冲液 (10mMPBS, pH = 7.4, 0.05% Tween-20) 除去多余酶标抗体。加入 50 μ L 鲁米诺溶液,然后加入 50 μ L 的 H₂O₂ 溶液,测其光强,所测光强与浓度线性相关,测得的标准曲线如图 1,其检测的线性范围为 20 ~ 1000pg/mL,相关系数 R² = 0.9567。获得了较好的检测结果,在临床检测方面具有良好的应用前景。

[0029] 以上实施例只是为了说明本发明,而不是对本发明的限制。在上述说明的基础上,可以对本发明作许多改进和改变。在所附权利要求书的范围内,本发明可以有不同于上述

的其它实现方式,选用其它同性相关试剂等方法均在本发明的权利要求保护范围之内。

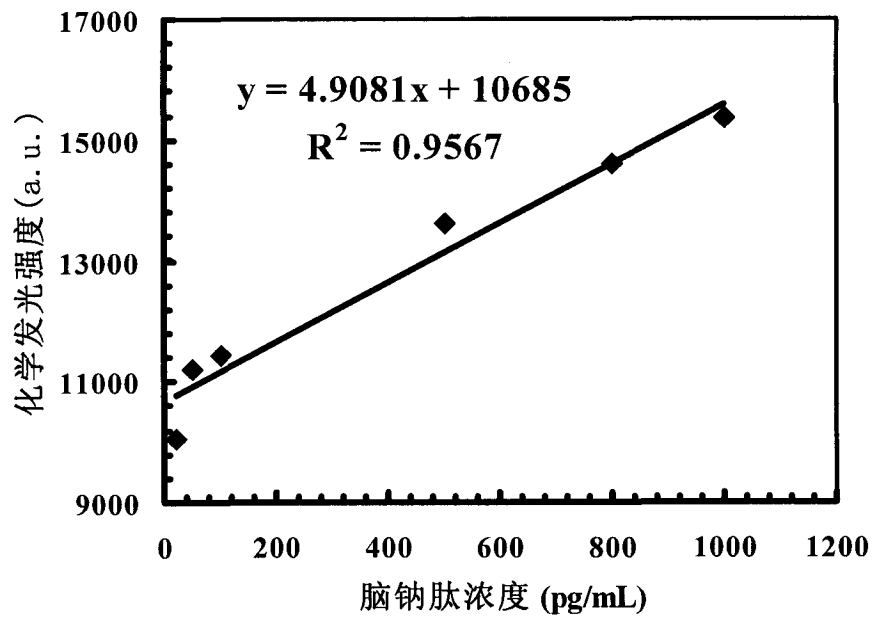


图 1

专利名称(译)	一种基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法		
公开(公告)号	CN102213724A	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	CN201010145084.X	申请日	2010-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院电子学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院电子学研究所		
[标]发明人	刘儒平 蔡新霞 刘军涛 刘春秀 罗金平 王蜜霞		
发明人	刘儒平 蔡新霞 刘军涛 刘春秀 罗金平 王蜜霞		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N21/76		
代理人(译)	周长兴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于化学发光的痕量蛋白快速检测方法，主要步骤为：1)待测蛋白与酶标抗体的反应形成免疫复合物；2)抗体修饰的磁性微纳粒子与上述免疫复合物反应，形成双抗体夹心复合物；3)在磁场中对双抗体夹心复合物洗涤，去除多余酶标抗体。本发明不仅操作简单，所用试剂量少，成本低廉，适合心肌标志物类、内分泌激素类、肿瘤标志物类等蛋白的快速检测。

