



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187956 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811029406.7

(22)申请日 2018.09.05

(71)申请人 杭州莱和生物技术有限公司

地址 310052 浙江省杭州市滨江区长河街
道滨安路688号2幢B楼一层、五层505-
512室

(72)发明人 汪惠泽 欧阳云 叶肖俊 葛秀龙

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246

代理人 黎双华 李欣玮

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法及其应用。本发明的标记方法为：(1)将时间分辨荧光微球用缓冲液充分混合，然后低温高速离心；(2)将离心后的沉淀复溶，并通过超声分散均匀，将待标记抗体加入到复溶液中，振荡反应；(3)然后在步骤(2)的溶液中加入偶联剂进行偶联反应，低温高速离心；(4)将离心后的沉淀复溶，然后加入封闭液进行封闭反应，之后低温高速离心；(5)将离心后的沉淀复溶，并通过超声分散均匀，即获得时间分辨荧光微球标记的抗体。本发明标记方法简单，重复性好，便于大规模应用，该方法标记的荧光抗体可应用于免疫诊断的各种不同领域，为体外诊断提供更加方便快捷的检测手段。

1. 一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) 将时间分辨荧光微球用缓冲液充分混合,然后低温高速离心;
 - (2) 将步骤(1)离心后的沉淀复溶,并通过超声分散均匀,然后将待标记抗体加入到复溶液中,振荡反应一定时间;
 - (3) 反应结束后在步骤(2)的溶液中加入偶联剂进行偶联反应,之后低温高速离心去除上清液;
 - (4) 将步骤(3)离心后的沉淀复溶,然后加入封闭液进行封闭反应,之后低温高速离心去除上清液;
 - (5) 将步骤(4)离心后的沉淀复溶,并通过超声分散均匀,即获得时间分辨荧光微球标记的抗体。
2. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述缓冲液为PBS缓冲液。
3. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述抗体源自鼠、兔、羊、鸡或人,所述时间分辨荧光微球与抗体的质量比为1mg:20-30 μ g。
4. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述偶联剂为戊二醛;所述时间分辨荧光微球与偶联剂的质量比为1:0.1-0.3,偶联时间为1-1.5h。
5. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述封闭剂为酪蛋白,所述时间分辨荧光微球与封闭剂的质量比为1:1-1.5,封闭反应时间为30-45min。
6. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述步骤(1)低温高速离心的离心速度为13000-15000rpm,离心温度为2-8 $^{\circ}$ C,离心时间为15-25min;步骤(3)和步骤(4)低温高速离心的离心速度为10000-13000rpm,离心温度为2-8 $^{\circ}$ C,离心时间为15-25min。
7. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述超声分散的功率为100W,超声时间为10-20s。
8. 根据权利要求1所述的抗体标记方法,其特征在于,所述步骤(2)的振荡反应通过振荡反应器完成,反应时间为0.5-1h。
9. 一种如权利要求1-8所述的抗体标记方法得到的时间分辨荧光微球偶联的抗体在生物、医学检验中的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用,所述生物、医学检验包括酶联免疫吸附、侧向免疫层析、蛋白印迹。

一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析技术领域,特别是涉及一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法及其应用。

背景技术

[0002] 对某些抗原或特异性蛋白进行检测时,通常会应用到免疫标记技术。免疫标记技术是将既容易测定又具有高敏感性的物质标记到特异性抗原或者抗体蛋白上,通过这些标记物的增强放大作用来显示反应体系中抗原或者抗体的性质和含量的技术。

[0003] 目前常用的标记物包括胶体金、乳胶、荧光素、酶和放射性核素等。但在实际应用中,这些免疫标记技术都存在不同缺陷。例如在胶体金和乳胶标记技术中,存在灵敏度低、线性范围窄的缺点而无法满足市场对免疫诊断产品的需求;在荧光素标记技术中,荧光素存在荧光寿命和荧光效率的问题,且标记到抗原或抗体上的方法复杂;酶标记技术中,酶容易失活,从而影响待测物的检出限;放射性核素标记技术中,核素具有放射性,存在强烈的环境污染和健康危害。此外,采用这些方法在临床应用过程中,在读出方式上也有很大的不同。比如胶体金和乳胶肉眼判读,存在一定的人为主观性;荧光素标记技术、酶标技术、放射性核素技术的操作过程较为复杂且需要高额的设备费用和维护费用,同时不利于携带和搬运。而这些条件往往决定了检测的客观性和很多检测不能在条件落后及不发达地区开展。因此,目前市场对操作简单、结果判读客观、高灵敏度、检测费用更为便宜、更利于大范围推广的免疫标记方法和检测技术有进一步的需求。

[0004] 目前,时间分辨荧光免疫分析法是与化学发光、电化学发光并驾齐驱的三种超敏免疫分析方法之一。其原理是采用较长荧光半衰期的稀土离子作标记物,由于这种标记物 Stokes 位移大($>150\text{nm}$)且荧光寿命比本底物质荧光寿命高5~6个数量级,因此,测定时只要延缓测量时间,待本底物质的荧光充分衰减后再测定标记物的信号就可有效地消除各种非特异性荧光的干扰,获得很高的灵敏度。

[0005] 时间分辨荧光微球(Time Resolved Fluorescent Microsphere)作为一种特殊的功能微球,每个微球中可包裹成千上万个荧光分子,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度;同时荧光微球表面修饰有合适密度的羧基或其它功能基团,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高了标记物的稳定性。更为重要的是由于微球包埋的稀土离子已经过了螯合,无需解离增强步骤,因此从根本上解决了传统的DELFIA法只能在液相中而不能在固相界面反应的问题,从而解决了将时间分辨荧光应用于免疫层析平台的技术瓶颈,在此基础上可开发出灵敏度高于普通胶体金或有色乳胶免疫层析方法1-3个数量级的定量检测技术。同样时间分辨荧光微球也可以用于微孔板超敏定量检测技术平台,只需洗涤几次后即可进行荧光测定,操作步骤比传统的DELFIA简单很多,更容易实现自动化操作。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的缺陷与不足,提供一种采用时间分辨荧

光微球标记抗体的方法及其应用,该方法无需借助于特殊和昂贵的仪器即可实现方便、快速及规模化生产。该方法标记的荧光抗体可应用于免疫诊断的各种不同领域,为体外诊断提供更加方便快捷的检测手段。

[0007] 为了达到上述的目的,本发明采取以下技术方案:

[0008] 一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 将时间分辨荧光微球用缓冲液充分混合,然后低温高速离心;

[0010] (2) 将步骤(1)离心后的沉淀复溶,并通过超声分散均匀,然后将待标记抗体加入到复溶液中,振荡反应一定时间;

[0011] (3) 反应结束后在步骤(2)的溶液中加入偶联剂进行偶联反应,之后低温高速离心去除上清液;

[0012] (4) 将步骤(3)离心后的沉淀复溶,然后加入封闭液进行封闭反应,之后低温高速离心去除上清液;

[0013] (5) 将步骤(4)离心后的沉淀复溶,并通过超声分散均匀,即获得时间分辨荧光微球标记的抗体。

[0014] 进一步地,所述步骤(1)的缓冲液为PBS缓冲液。

[0015] 进一步地,所述步骤(1)低温高速离心的离心速度为13000-15000rpm,离心温度为2-8℃,离心时间为15-25min。

[0016] 进一步地,所述步骤(2)和步骤(5)超声分散的功率为100W,超声时间为10-20s。

[0017] 进一步地,所述时间分辨荧光微球与抗体的质量比为1mg:20-30μg。

[0018] 进一步地,所述步骤(2)的振荡反应通过振荡反应器完成,反应时间为0.5-1h。

[0019] 进一步地,所述抗体源自鼠、兔、羊、鸡或人。

[0020] 进一步地,所述步骤(3)的偶联剂为戊二醛。

[0021] 进一步地,所述时间分辨荧光微球与偶联剂的质量比为1:0.1-0.3,偶联时间为1-1.5h。

[0022] 进一步地,所述步骤(4)的封闭剂为酪蛋白。

[0023] 进一步地,所述时间分辨荧光微球与封闭剂的质量比为1:1-1.5,封闭反应时间为30-45min。

[0024] 进一步地,所述步骤(3)和步骤(4)低温高速离心的离心速度为10000-13000rpm,离心温度为2-8℃,离心时间为15-25min。

[0025] 本发明还提供上述方法得到的时间分辨荧光微球偶联的抗体在生物、医学检验中的应用。

[0026] 进一步地,所述生物、医学检验包括酶联免疫吸附、侧向免疫层析、蛋白印迹。

[0027] 本发明通过对抗体进行时间分辨荧光微球标记后,抗体可以与待检测样本中的检测目标(例如抗原或其它能够与被标记抗体相结合的蛋白质等)进行稳定、有效的结合,进而通过检测时间分辨荧光微球的荧光信号值实现对待检测目标或反应的检测,通过固定的信号读数仪完成。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0029] 1、本发明提供的抗体标记技术可以克服现有抗体标记技术的缺点,如抗体和微球标记过程容易聚集沉淀,批间差异大,标记效价不高,需要较复杂的仪器纯化等问题,本发

明标记方法简单,重复性好,便于大规模应用。

[0030] 2、本发明使用的偶联剂可以在水溶液中高效的将微球上的氨基与抗体蛋白上的氨基充分偶联。

[0031] 3、本发明使用的封闭剂可以更有效的降低免疫反应过程中的非特异性的问题,从而降低假阳等问题。

[0032] 4、本发明时间分辨荧光微球标记后的抗体检测具有更低的信号值和更宽的信号范围。

[0033] 5、本发明提供的抗体标记的方法需要借助固定的检测设备完成检测,解决了肉眼判断的主观性。

[0034] 6、本发明在免疫诊断中的应用不需要昂贵仪器,操作流程简便,成本低,便于在条件落后及不发达地区开展应用。

具体实施方式

[0035] 以下具体实施例是对本发明提供的方法与技术方案的进一步说明,但不应理解成对本发明的限制。

[0036] 具体实施方式中采用的标记方法如下:

[0037] (a) 取100 μ l (1mg) 空白时间分辨荧光微球加入到1ml离心管内,然后加入0.2ml PBS缓冲液 (0.01M, pH7.4), 充分振荡混匀, 13000-15000rpm, 15-25min, 2-8 $^{\circ}$ C离心, 离心后去上清液;

[0038] (b) 加入0.3ml PBS缓冲液 (0.01M, pH7.4) 复溶, 并在功率为100W的超声机中, 超声10-20s, 加入待标记抗体20-30 μ g充分振荡混匀0.5-1h;

[0039] (c) 在反应结束后的溶液中加入0.1-0.3mg的戊二醛溶液, 充分振荡混匀, 避光反应1-1.5h;

[0040] (d) 13000-15000rpm, 15-25min, 2-8 $^{\circ}$ C离心, 离心后去上清液, 再加入0.3ml PBS缓冲液 (0.01M, pH7.4) 复溶, 并在功率为100W的超声机中, 超声10-20s;

[0041] (e) 称取一定量的酪蛋白, 然后使用PBS缓冲液将其配制成0.5%酪蛋白溶液;

[0042] (f) 在与抗体偶联后的荧光微球溶液中加入0.2-0.3ml 0.5%酪蛋白溶液, 充分振荡, 避光反应30-45min;

[0043] (g) 10000-13000rpm, 15-25min, 2-8 $^{\circ}$ C离心, 离心后去上清液, 再加入0.3ml PBS缓冲液 (0.01M, pH7.4) 复溶, 并在功率为100W的超声机中, 超声10-20s; 得到时间分辨荧光微球标记的抗体。

[0044] 实施例1: 用时间分辨荧光微球标记兔IgG抗体

[0045] 量取100 μ l时间分辨荧光微球 (购于bangs公司, 粒径200nm), 加入0.2ml PBS缓冲液 (0.01M, pH7.4) 振荡混匀, 13000rpm, 15min, 2-8 $^{\circ}$ C离心, 去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶, 100W超声10s分散, 然后加入20 μ g的兔IgG, 振荡反应0.5h, 反应结束后加入0.1mg戊二醛溶液, 避光反应1h, 反应结束后13000rpm, 15min, 2-8 $^{\circ}$ C离心, 去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶, 100W超声10s分散, 然后加入0.2ml 0.5%酪蛋白溶液, 反应30min, 反应结束后10000rpm, 15min, 2-8 $^{\circ}$ C离心取上清, 然后用0.3ml PBS缓冲液复溶, 100W超声10s分散, 得到的荧光标记兔IgG在2-8 $^{\circ}$ C保存待用。

[0046] 实施例2:用时间分辨荧光微球标记鼠IgG抗体

[0047] 量取100 μ l时间分辨荧光微球(购于bangs公司,粒径200nm),加入0.2mLPBS缓冲液(0.01M,pH7.4)振荡混匀,13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入20 μ g的鼠IgG,振荡反应0.5h,反应结束后加入0.1mg戊二醛溶液,避光反应1h,反应结束后13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入0.2ml 0.5%酪蛋白溶液,反应30min,反应结束后10000rpm,15min,2-8℃离心取上清,然后用0.3ml PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,得到的荧光标记兔IgG在2-8℃保存待用。

[0048] 实施例3:用时间分辨荧光微球标记人IgG抗体

[0049] 量取100 μ l时间分辨荧光微球(购于bangs公司,粒径200nm),加入0.2mLPBS缓冲液(0.01M,pH7.4)振荡混匀,13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入20 μ g的人IgG,振荡反应0.5h,反应结束后加入0.1mg戊二醛溶液,避光反应1h,反应结束后13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入0.2ml 0.5%酪蛋白溶液,反应30min,反应结束后10000rpm,15min,2-8℃离心取上清,然后用0.3ml PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,得到的荧光标记兔IgG在2-8℃保存待用。

[0050] 实施例4:用时间分辨荧光微球标记鸡IgG抗体

[0051] 量取100 μ l时间分辨荧光微球(购于bangs公司,粒径200nm),加入0.2mLPBS缓冲液(0.01M,pH7.4)振荡混匀,13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入20 μ g的鸡IgG,振荡反应0.5h,反应结束后加入0.1mg戊二醛溶液,避光反应1h,反应结束后13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入0.2ml 0.5%酪蛋白溶液,反应30min,反应结束后10000rpm,15min,2-8℃离心取上清,然后用0.3ml PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,得到的荧光标记兔IgG在2-8℃保存待用。

[0052] 实施例5:用时间分辨荧光微球标记吗啡抗体(MOP-Mab)

[0053] 量取100 μ l时间分辨荧光微球(购于bangs公司,粒径200nm),加入0.2mLPBS缓冲液(0.01M,pH7.4)振荡混匀,13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入20 μ g的吗啡抗体,振荡反应0.5h,反应结束后加入0.1mg戊二醛溶液,避光反应1h,反应结束后13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入0.2ml 0.5%酪蛋白溶液,反应30min,反应结束后10000rpm,15min,2-8℃离心取上清,然后用0.3ml PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,得到的荧光标记兔IgG在2-8℃保存待用。

[0054] 实施例6:用时间分辨荧光微球标记肌钙蛋白I抗体(cTnI-Mab)

[0055] 量取100 μ l时间分辨荧光微球(购于bangs公司,粒径200nm),加入0.2mLPBS缓冲液(0.01M,pH7.4)振荡混匀,13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入20 μ g的肌钙蛋白I抗体,振荡反应0.5h,反应结束后加入0.1mg戊二醛溶液,避光反应1h,反应结束后13000rpm,15min,2-8℃离心,去上清后用0.3ml的PBS缓冲液复溶,100W超声10s分散,然后加入0.2ml 0.5%酪蛋白溶液,反应30min,反应结束后10000rpm,15min,2-8℃离心取上清,然后用0.3ml PBS缓冲液复溶,100W超声10s分

散,得到的荧光标记兔IgG在2-8℃保存待用。

[0056] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求保护范围内。

专利名称(译)	一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法及其应用		
公开(公告)号	CN109187956A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201811029406.7	申请日	2018-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	杭州莱和生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州莱和生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州莱和生物技术有限公司		
[标]发明人	汪惠泽 欧阳云 叶肖俊 葛秀龙		
发明人	汪惠泽 欧阳云 叶肖俊 葛秀龙		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种时间分辨荧光微球偶联的抗体标记方法及其应用。本发明的标记方法为：(1)将时间分辨荧光微球用缓冲液充分混合，然后低温高速离心；(2)将离心后的沉淀复溶，并通过超声分散均匀，将待标记抗体加入到复溶液中，振荡反应；(3)然后在步骤(2)的溶液中加入偶联剂进行偶联反应，低温高速离心；(4)将离心后的沉淀复溶，然后加入封闭液进行封闭反应，之后低温高速离心；(5)将离心后的沉淀复溶，并通过超声分散均匀，即获得时间分辨荧光微球标记的抗体。本发明标记方法简单，重复性好，便于大规模应用，该方法标记的荧光抗体可应用于免疫诊断的各种不同领域，为体外诊断提供更加方便快捷的检测手段。