



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103869077 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201210544158.6

(22) 申请日 2012.12.14

(71) 申请人 北京和杰创新生物医学科技有限公司

地址 北京市昌平区回龙观镇生命园路29号
孵化科研生产大楼B座203-204

(72) 发明人 孙正刚 朱京山

(74) 专利代理机构 天津三元专利商标代理有限公司
12203

代理人 胡婉明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

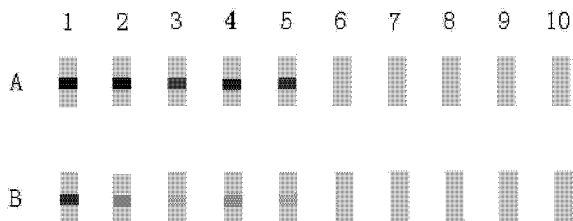
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

提升包被抗原反应活性的工艺方法

(57) 摘要

本发明提供一种提升包被抗原反应活性的工艺方法,包括根据抗原自身特点配制相应的包被缓冲液,其改进之处在于,在所述配制好的包被缓冲液中依次加入下列物质:(1)加入低浓度蛋白质变性剂,使加入的蛋白质变性剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(2)加入低浓度蛋白质还原剂,使加入的蛋白质还原剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(3)按照已确定的使用浓度加入抗原,搅拌,使其充分溶解在加入蛋白质变性剂和蛋白质还原剂的包被缓冲液中;(4)将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于2-8℃条件下放置多个小时;(5)将上述经过处理后的包被缓冲液,按照所需包被量进行抗原包被;有效提升包被抗原的反应活性,提高检测灵敏度。



1. 一种提升包被抗原反应活性的工艺方法,包括根据抗原自身特点配制相应的包被缓冲液;其特征在于,在所述配制好的包被缓冲液中依次加入下列物质:(1)加入低浓度蛋白质变性剂,使加入的蛋白质变性剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(2)加入低浓度蛋白质还原剂,使加入的蛋白质还原剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(3)按照已确定的使用浓度加入抗原,搅拌,使其充分溶解在加入蛋白质变性剂和蛋白质还原剂的包被缓冲液中;(4)将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于 2-8℃条件下放置多个小时;(5)将上述经过处理后的包被缓冲液,按照所需包被量进行抗原包被。

2. 根据权利要求 1 所述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其特征在于,所述配制好的包被缓冲液中加入的蛋白质变性剂优选尿素、十二烷基硫酸钠或者十二烷基肌氨酸钠,加入的浓度为 0.005 至 0.05mol/L。

3. 根据权利要求 1 所述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其特征在于,所述配制好的包被缓冲液中加入的蛋白质还原剂优选半胱氨酸、磷酸三(β-氯乙基)酯或者 β-巯基乙醇,加入的浓度为 0.005 至 0.05mol/L。

4. 根据权利要求 1 所述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其特征在于,将所述含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于 2-8℃条件放置的时间为 12 至 16 小时。

5. 根据权利要求 1 所述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其特征在于:所述抗原优选 U1-nRNP、SS-B 或者 Jo-1。

6. 根据权利要求 1 所述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其特征在于:所述包被缓冲液优选磷酸缓冲液(PB)、磷酸盐缓冲液(PBS)、碳酸盐缓冲液(CB)、Tris-Hcl 缓冲液或者硼酸盐缓冲液(BBS)。

7. 一种如权利要求 1 所述的提升包被抗原反应活性的工艺方法在酶联免疫吸附试验、酶联免疫斑点法试验或者胶体金快速检测试验中的应用。

提升包被抗原反应活性的工艺方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物体外诊断试剂的制备,尤其涉及一种提升包被抗原反应活性的工艺方法。

背景技术

[0002] 目前,免疫学检测技术及其产品已广泛应用于重大传染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤标志物、食品安全及优生优育等众多检测领域,在这些检测技术如酶联免疫吸附试验,酶联免疫斑点法试验,胶体金快速检测试验中,抗原的包被都是检测前必不可少的重要环节。目前抗原的包被都是根据抗原自身的特点,如等电点、自身结构、所带电荷等选择相应的包被缓冲液,所用包被缓冲液包括磷酸缓冲液 PB、磷酸盐缓冲液 PBS、碳酸盐缓冲液 CB、Tris-Hcl 缓冲液、硼酸盐缓冲液 BBS 等,包被的结果是通过物理作用使抗原吸附于包被载体表面,使得后续的免疫反应得以进行。现有包被技术所忽略的问题是抗原吸附于载体表面后所产生的空间结构变化,这种变化会导致位于抗原表面的一部分抗原决定簇埋藏于抗原结构内部,无法与其对应的特异性抗体发生结合,由此而产生的特异性结合的抗体数量就会减少,最终导致检测灵敏度水平有所下降。因而如何解决抗原表面的抗原决定簇减少这个问题,成为提升抗原反应活性、提高检测灵敏度水平以及改善产品性能的关键。因此,有待研究提升抗原反应活性的方法。

发明内容

[0003] 本发明的主要目的在于克服现有产品存在的上述缺点,而提供一种提升包被抗原反应活性的工艺方法,通过改变包被缓冲液中的成分和抗原的处理方式,从而提升包被抗原的反应活性,提高检测灵敏度。

[0004] 本发明的目的是由以下技术方案实现的。

[0005] 本发明提升包被抗原反应活性的工艺方法,包括根据抗原自身特点配制相应的包被缓冲液;其特征在于,在所述配制好的包被缓冲液中依次加入下列物质:(1)加入低浓度蛋白质变性剂,使加入的蛋白质变性剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(2)加入低浓度蛋白质还原剂,使加入的蛋白质还原剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(3)按照已确定的使用浓度加入抗原,搅拌,使其充分溶解在加入蛋白质变性剂和蛋白质还原剂的包被缓冲液中;(4)将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于 2-8℃ 条件下放置多个小时;(5)将上述经过处理后的包被缓冲液,按照所需包被量进行抗原包被。

[0006] 前述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其中配制好的包被缓冲液中加入的蛋白质变性剂优选尿素、十二烷基硫酸钠或者十二烷基肌氨酸钠,加入的浓度为 0.005 至 0.05mol/L。

[0007] 前述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其中配制好的包被缓冲液中加入的蛋白质还原剂优选半胱氨酸、磷酸三(β-氯乙基)酯或者 β-巯基乙醇,加入的浓度为 0.005 至 0.05mol/L。

[0008] 前述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其中将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于 2-8℃ 条件放置的时间为 12 至 16 小时。

[0009] 前述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其中抗原优选 U1-nRNP、SS-B 或者 Jo-1。

[0010] 前述的提升包被抗原反应活性的工艺方法,其中包被缓冲液优选磷酸缓冲液(PB)、磷酸盐缓冲液(PBS)、碳酸盐缓冲液(CB)、Tris-Hcl 缓冲液或者硼酸盐缓冲液(BBS)。

[0011] 本发明提升包被抗原反应活性的工艺方法在酶联免疫吸附试验、酶联免疫斑点法试验或者胶体金快速检测试验中的应用。

[0012] 本发明提升包被抗原反应活性的工艺方法的有益效果,本发明通过改变包被缓冲液中的成分和抗原的处理方式,使抗原的部分高级结构得以打开,暴露出更多的抗原决定簇,能够结合更多的特异性抗体,从而有效提升抗原的反应活性。

[0013] 本发明通过加入低浓度的变性剂和还原剂,通过低温较长时间的处理达到提升包被抗原的反应活性,提高检测灵敏度的目的。低浓度的变性剂和还原剂可以部分地打开抗原的高级结构,弥补吸附载体后产生的构象变化所引起的抗原表面抗原决定簇减少的问题,同时又避免了对于抗原高级结构整体性地破坏,不会干扰免疫反应所需的低离子浓度条件下的温和环境;低温的处理方式会使抗原在处理过程中保持活性稳定,较长的处理时间会使处理效果达到最终的平衡,使差异化降到最低的程度。需要注意的是,不同的变性剂及还原剂对抗原结构产生的影响不尽相同,所带来的抗原决定簇变化是不能完全预见的,因此针对不同的具体抗原应采用区别性的变性剂及还原剂。

附图说明:

[0014] 图 1 为使用本发明方法和现有技术处理包被抗原后检测结果图。

[0015] 图中主要标号说明:

[0016] 1-5 列是 5 份 U1-nRNP 阳性样本检测结果。

[0017] 6-10 列是 5 份 U1-nRNP 阴性样本检测结果。

[0018] A 行是使用本发明的方法处理包被抗原后的检测结果。

[0019] B 行是使用现有技术包被抗原后的检测结果。

[0020] 图 2 为使用本发明方法和现有技术处理包被抗原后检测结果图。

[0021] 图中主要标号说明:

[0022] 11-15 列是 5 份 SS-B 阳性样本检测结果。

[0023] 16-20 列是 5 份 SS-B 阴性样本检测结果。

[0024] C 行是使用本发明的方法处理包被抗原后的检测结果。

[0025] D 行是使用现有技术包被抗原后的检测结果。

[0026] 图 3 为使用本发明方法和现有技术处理包被抗原后检测结果图。

[0027] 图中主要标号说明:

[0028] 21-25 列是 5 份 Jo-1 阳性样本检测结果。

[0029] 26-30 列是 5 份 Jo-1 阴性样本检测结果。

[0030] E 行是使用本发明的方法处理包被抗原后的检测结果。

[0031] F 行是使用现有技术包被抗原后的检测结果。

具体实施方式

[0032] 本发明提升包被抗原反应活性的工艺方法,包括根据抗原自身特点配制相应的包被缓冲液;其改进之处是在所述配制好的包被缓冲液中依次加入下列物质:(1)加入低浓度蛋白质变性剂,使加入的蛋白质变性剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(2)加入低浓度蛋白质还原剂,使加入的蛋白质还原剂溶解于配制好的包被缓冲液中;(3)按照已确定的使用浓度加入抗原,搅拌,使其充分溶解在加入蛋白质变性剂和蛋白质还原剂的包被缓冲液中;(4)将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于 2-8℃ 条件下放置多个小时;(5)将上述经过处理后的包被缓冲液,按照所需包被量进行抗原包被。

[0033] 本发明提升包被抗原反应活性的工艺方法,其中,该配制好的包被缓冲液中加入的蛋白质变性剂优选尿素、十二烷基硫酸钠或者十二烷基肌氨酸钠,加入的浓度为 0.005 至 0.05mol/L。该配制好的包被缓冲液中加入的蛋白质还原剂优选半胱氨酸、磷酸三(β-氯乙基)酯或者 β-巯基乙醇,加入的浓度为 0.005 至 0.05mol/L。将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于 2-8℃ 条件放置的时间为 12 至 16 小时。该抗原优选 U1-nRNP、SS-B 或者 Jo-1。该包被缓冲液优选磷酸缓冲液(PB)、磷酸盐缓冲液(PBS)、碳酸盐缓冲液(CB)、Tris-Hcl 缓冲液或者硼酸盐缓冲液(BBS)。

[0034] 本发明提升包被抗原反应活性的工艺方法可以在酶联免疫吸附试验、酶联免疫斑点法试验或者胶体金快速检测试验中应用。

[0035] 实施例 1:

[0036] 在 1000ml 蒸馏水中依次加入下列物质:

[0037] A 配制 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 PBS, pH7.2;

[0038] B 在上述缓冲液中加入尿素,浓度为 0.005mol/L,搅拌,使其充分溶解;

[0039] C 加入分析纯的半胱氨酸,浓度为 0.005mol/L,搅拌,使其充分溶解;

[0040] D 加入 U1-nRNP 抗原,浓度 1%,搅拌,使其充分溶解;

[0041] E 将上述含有尿素、半胱氨酸、U1-nRNP 抗原的缓冲溶液置于 2-8℃ 条件放置处理 12 小时;

[0042] F 使用上述经过 2-8℃ 条件处理后的溶液,根据 1 μ l/cm 的包被量按照酶联免疫斑点法进行包被。

[0043] 如图 1 所示,1-5 列是 5 份 U1-nRNP 阳性样本检测结果,6-10 列是 5 份 U1-nRNP 阴性样本检测结果。A 行是使用本发明的方法处理包被抗原后的检测结果,B 行是使用现有技术包被抗原后的检测结果。阴性样本斑块中间无显色条带,阳性样本斑块中间显色条带越深,说明样本的阳性程度越强,对于同一份阳性样本来说,显色条带越深说明包被抗原反应活性越强,检测灵敏度水平越高。由附图可以清楚地看出,在 5 份 U1-nRNP 阳性样本中,经过本发明方法处理过包被抗原的检测结果显色条带比现有技术的检测结果显色条带明显加深,而 5 份 U1-nRNP 阴性样本检测结果两种方法一致。结果说明,本发明处理方法可有效提升包被抗原的反应活性,提高检测灵敏度水平。

[0044] 实施例 2:

[0045] 在 1000ml 蒸馏水中依次加入下列物质:

[0046] A 配制 0.02 mol/L 碳酸盐缓冲液(CB), pH9.6;

[0047] B 在上述缓冲液中加入十二烷基硫酸钠,浓度为 0.02mol/L,搅拌,使其充分溶解;
[0048] C 加入分析纯的磷酸三(β-氯乙基)酯,浓度为 0.02mol/L,搅拌,使其充分溶解;
[0049] D 加入 SS-B 抗原,浓度 2%,搅拌,使其充分溶解;
[0050] E 将上述含有十二烷基硫酸钠、磷酸三(β-氯乙基)酯、SS-B 抗原的缓冲溶液置于 2-8℃条件放置处理 14 小时;
[0051] F 使用上述经过 2-8℃条件处理后的溶液,根据 1 μ l/cm 的包被量按照酶联免疫斑点法进行包被。

[0052] 如图 2 所示,11-15 列是 5 份 SS-B 阳性样本检测结果,16-20 列是 5 份 SS-B 阴性样本检测结果。C 行是使用本发明的方法处理包被抗原后的检测结果,D 行是使用现有技术包被抗原后的检测结果。阴性样本斑块中间无显色条带,阳性样本斑块中间显色条带越深,说明样本的阳性程度越强,对于同一份阳性样本来说,显色条带越深说明包被抗原反应活性越强,检测灵敏度水平越高。由附图可以清楚地看出,在 5 份 SS-B 阳性样本中,经过本发明方法处理过包被抗原的检测结果显色条带比现有技术的检测结果显色条带明显加深,而 5 份 SS-B 阴性样本检测结果两种方法一致。结果说明,本发明处理方法可有效提升包被抗原的反应活性,提高检测灵敏度水平。

[0053] 实施例 3:

[0054] 在 1000ml 蒸馏水中依次加入下列物质:

[0055] A 配制 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.2;

[0056] B 在上述缓冲液中加入十二烷基肌氨酸钠,浓度为 0.05mol/L,搅拌,使其充分溶解;

[0057] C 加入 β-巯基乙醇,浓度为 0.05mol/L,搅拌,使其充分溶解;

[0058] D 加入 Jo-1 抗原,浓度 1%,搅拌,使其充分溶解;

[0059] E 将上述含有十二烷基肌氨酸钠、β-巯基乙醇、Jo-1 抗原的缓冲溶液置于 2-8℃条件放置处理 16 小时;

[0060] F 使用上述经过 2-8℃条件处理后的溶液,根据 1 μ l/cm 的包被量按照酶联免疫斑点法进行包被。

[0061] 如图 3 所示,21-25 列是 5 份 Jo-1 阳性样本检测结果,26-30 列是 5 份 Jo-1 阴性样本检测结果。E 行是使用本发明的方法处理包被抗原后的检测结果,F 行是使用现有技术包被抗原后的检测结果。阴性样本斑块中间无显色条带,阳性样本斑块中间显色条带越深,说明样本的阳性程度越强,对于同一份阳性样本来说,显色条带越深说明包被抗原反应活性越强,检测灵敏度水平越高。由附图可以清楚地看出,在 5 份 Jo-1 阳性样本中,经过本发明方法处理过包被抗原的检测结果显色条带比现有技术的检测结果显色条带明显加深,而 5 份 Jo-1 阴性样本检测结果两种方法一致。结果说明,本发明处理方法可有效提升包被抗原的反应活性,提高检测灵敏度水平。

[0062] 使用经过 2-8℃条件处理后的缓冲溶液,根据 1 μ l/cm 的包被量还可以按照胶体金快速检测试验方法进行包被,根据 100 μ l/孔的包被量还可以按照酶联免疫吸附试验方法进行包被。

[0063] 本实施例中未将进行说明的内容为现有技术,故,不再进行赘述。

[0064] 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,凡

是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、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

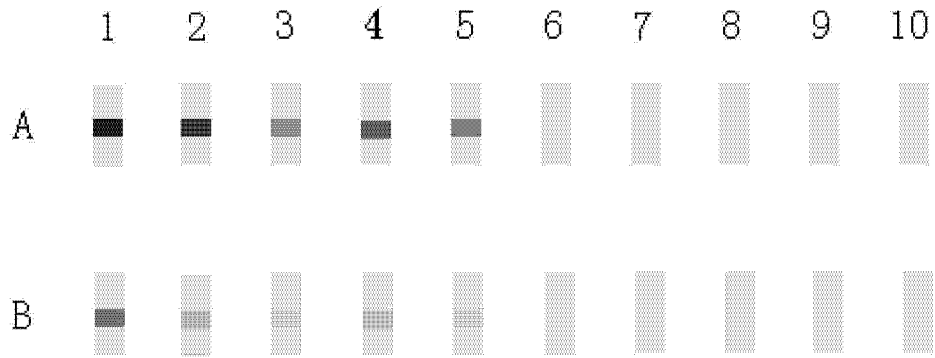


图 1

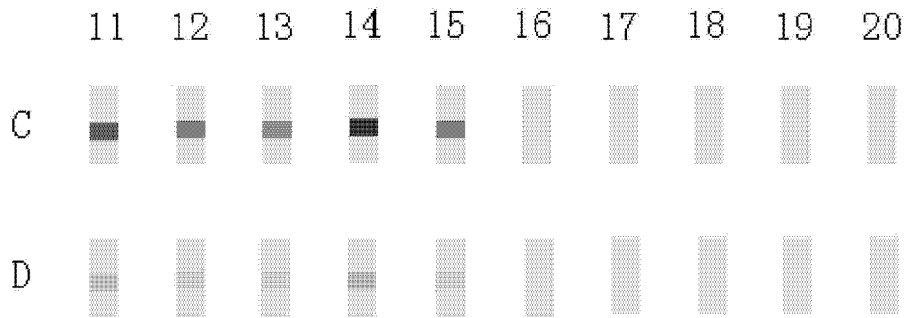


图 2

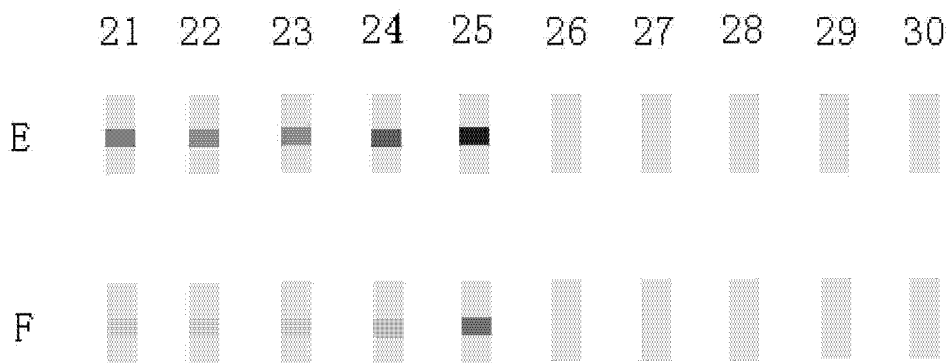


图 3

专利名称(译)	提升包被抗原反应活性的工艺方法		
公开(公告)号	CN103869077A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201210544158.6	申请日	2012-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京和杰创新生物医学科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京和杰创新生物医学科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京和杰创新生物医学科技有限公司		
[标]发明人	孙正刚 朱京山		
发明人	孙正刚 朱京山		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	胡婉明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种提升包被抗原反应活性的工艺方法，包括根据抗原自身特点配制相应的包被缓冲液，其改进之处在于，在所述配制好的包被缓冲液中依次加入下列物质：（1）加入低浓度蛋白质变性剂，使加入的蛋白质变性剂溶解于配制好的包被缓冲液中；（2）加入低浓度蛋白质还原剂，使加入的蛋白质还原剂溶解于配制好的包被缓冲液中；（3）按照已确定的使用浓度加入抗原，搅拌，使其充分溶解在加入蛋白质变性剂和蛋白质还原剂的包被缓冲液中；（4）将含有蛋白质变性剂、蛋白质还原剂、抗原的包被缓冲液置于2-8°C条件下放置多个小时；（5）将上述经过处理后的包被缓冲液，按照所需包被量进行抗原包被；有效提升包被抗原的反应活性，提高检测灵敏度。

