



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102207501 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 05

(21) 申请号 201110068782. 9

G01N 33/535(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 22

(71) 申请人 沃克(天津)生物科技有限公司

地址 300384 天津市南开区华苑产业园区榕苑路16号鑫茂科技园A座IJ单元6层右侧

(72) 发明人 王洪 李会强 杨静 苑凤君 刘志勇

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司 12103

代理人 董光仁

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

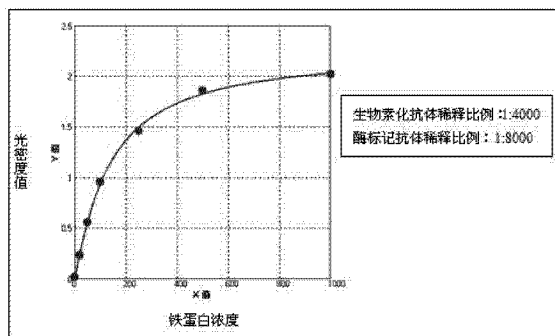
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板及其制备方法,属于检验医学中标记免疫分析技术。本发明包括聚苯乙烯酶标板,而在每个微孔内分别包被有生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素;另将生物素化抗体液相保存作为反应试剂备用。检测时,将生物素化抗体与待测抗原同时加入到本发明酶标反应板上,生物素化抗体与待测抗原反应同时,生物素分子与链霉亲和素结合被固定在固相材料表面。本发明将待测抗原与生物素化抗体置于液相中,可提高反应速率,拓宽铁蛋白检测范围,减少双抗体夹心试验中的“钩状效应”。酶标反应灵敏度、准确度、精密度等指标均符合技术要求。提高包被抗体利用效率,减少抗体用量,大幅度降低试剂盒成本。



1. 一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板,包括聚苯乙烯酶标板,其特征在于:酶标板的每个微孔内分别包被有稀释比例为 1:2850-3150 的生物素化牛血清白蛋白和稀释比例为 1:3800-4200 的链霉亲和素;另将生物素化抗体 0.1M 磷酸盐缓冲盐水 4℃ 液相保存,作为反应试剂备用。

2. 根据权利要求 1 所述一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板,其特征在于:酶标板的每个微孔内分别包被有稀释比例为 1:3000 的生物素化牛血清白蛋白和稀释比例为 1:4000 的链霉亲和素;另将生物素化抗体、0.1M 磷酸盐缓冲盐水 4℃ 液相保存,作为反应试剂备用。

3. 根据权利要求 1 所述一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,包括聚苯乙烯酶标板,其特征在于:聚苯乙烯酶标板每孔加入生物素化牛血清白蛋白与稀释液 I 按 1:2850-3150 比例稀释的生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液 150 μ l,室温温浴 16h ~ 18h,甩净包被缓冲液,用稀释液 I 洗酶标板 2 次,每次需静置 10min,拍干;

每孔再加入链霉亲和素与稀释液 II 按 1:3800-4200 比例稀释的链霉亲和素包被缓冲液 150 μ l,常温温浴 2h 甩净包被缓冲液,用稀释液 II 洗酶标板 2 次,每次需静置 10min,甩净稀释液 II,最后每孔加入 250 μ l 封闭溶液,4℃ 温浴过夜,甩净封闭溶液,真空干燥至少 6h,真空包装备用;

另将生物素化抗体 0.1M 磷酸盐缓冲盐水,4℃ 液相保存作为反应试剂备用。

4. 根据权利要求 3 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其特征在于:稀释液 I 是由以下原料制备的,

三羟甲基氨基甲烷	5.76-6.36g
氯化钠	8.33-9.21g
Proclin 300	0.5ml
蒸馏水	950 ml

调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

5. 根据权利要求 3 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其特征在于:稀释液 II 是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠	4.45-4.91g
磷酸氢二钠	6.8-7.52g
L-色氨酸	2.09-2.1g
氯化钠	8.33-9.21 g
蒸馏水	950 ml

调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

6. 根据权利要求 3 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其特征在于:封闭溶液是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠	0.138-0.152g
磷酸氢二钠	1.38-1.52g
6-氨基己烷	1.43-1.57g
氯化钠	4.16-4.6g
蒸馏水	450 ml 调 pH=7.3~ 7.5、

牛血清白蛋白	1.9-2.1g
蔗糖	16.63-18.37g
Procilin 300	0.25 ml
加蒸馏水	定溶至 500 ml。

7. 根据权利要求 3 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法, 其特征在于: 生物素化抗体是将抗体与生物素以摩尔比为 20 :1 的比例混合, 室温搅拌 1h, 将反应后的液体经 0.1M 磷酸盐缓冲盐水透析后 4°C 保存备用。

8. 根据权利要求 4 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法, 其特征在于: 稀释液 I 是由以下原料制备的,

三羟甲基氨基甲烷	6.06 g
氯化钠	8.77 g
Proclin 300	0.5ml
蒸馏水	950 ml

调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

9. 根据权利要求 5 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法, 其特征在于: 稀释液 II 是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠	4.68 g
磷酸氢二钠	7.16 g
L- 色氨酸	0.2 g
氯化钠	8.77 g
蒸馏水	950 ml

调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

10. 根据权利要求 6 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法, 其特征在于: 封闭溶液是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠	0.145 g
磷酸氢二钠	1.45 g
6- 氨基己烷	1.5 g
氯化钠	4.38 g
蒸馏水	450 ml 调 pH=7.3~ 7.5
牛血清白蛋白	2.0 g
蔗糖	17.5 g
Procilin 300	0.25 ml
加蒸馏水	定溶至 500 ml。

生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫分析技术,具体是一种包被生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素的酶标反应板及其制备方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是以酶标记抗体(或抗原)及包被有抗体(抗原)的酶标反应板为主要试剂,将抗原抗体反应的特异性和酶催化底物高效性相结合的一种标记免疫分析技术。ELISA 主要技术类型包括:双抗体夹心法,间接法、竞争法、捕获法等。双抗体夹心法是常用技术之一,可用于检测体内微量物质。

酶联免疫吸附试验属于非均相免疫分析,测定时需要分离结合标记物和游离标记物,才能使检测信号与抗原抗体反应强度相关。一般采用固相吸附方式实现游离标记物分离,测定结合标记物。即应用聚苯乙烯作为固相材料(微孔板,试管,微球),通过非特异性吸附方式连接特异性抗体。如标本中含有相应抗原,必将与特异性抗体结合,形成免疫复合物同样被固定在固相材料表面,未结合物质游离于液相中,通过洗涤方式即可去除。

[0003] 双抗体夹心酶联免疫测定法,需要将捕获抗体与酶标反应板(96孔微量反应板)结合,形成预先包被抗体的酶标反应板,这一过程称为包被(即制备酶标反应板)。加入待测抗原和酶标抗体后,所形成免疫复合物通过酶标反应板上的捕获抗体固定在反应板表面,过剩的酶标抗体(以及其他非特异物质)存在于液相中,弃除反应液并洗涤反应板,便能除去没有结合的标记物(酶标抗体)。酶标反应板是酶联免疫分析重要材料,因此,制备酶标反应板是酶联免疫吸附试验关键环节。

[0004] 传统酶标反应板制备采用非特异性吸附技术。制备方法是将特异性抗体用包被缓冲液(磷酸盐或碳酸盐)稀释至一定浓度($3\sim 10\text{ng/L}$),加入酶标反应板每个微孔中。由于聚苯乙烯具有吸附蛋白特性,能通过物理(电荷)吸附抗体分子。经过一段时间后,抗体即被固定于固相材料表面,同时保留原有抗体活性。由于包被液中蛋白浓度很低,抗体分子不能完全覆盖所有位点,为防止后续反应时发生非特异性吸附,需再加入高浓度牛血清白蛋白(bovine serum, albumin, BSA)($1\sim 2\%$),达到封闭空白位点目的。最后,弃除封闭溶液,经真空干燥包装即可。

[0005] 经典方法制备的酶标反应板是将抗体分子直接包被于酶标反应板表面,一般称为直接包被模式。直接包被模式具有操作简单、工艺成熟等优点。但是,直接包被模式存在诸多缺点,主要表现在如下方面:

其一,抗体分子被吸附在固相材料表面,由于抗原抗体反应依赖于空间构象,抗体固相化所导致的构象变化势必影响抗体的利用效率,导致抗原抗体之间亲和力的减低。

[0006] 其二、微量酶标板微孔内的表面积较小,导致包被抗体分子数量有限,加上固相化所导致利用率的降低,均会使抗体分子数量不能满足待测抗原的需求,影响试验方法的检测范围和检测时间。

[0007] 其三、固相化抗体分子处于静止状态,导致固相上抗体与液相中抗原的相碰撞几率永远小于液相反应,必然会增加抗原抗体反应达到平衡所需的时间。同时在一步法时,需同时加入待测抗原和酶标抗体,待测抗原与捕获抗体的反应速率小于待测抗原与酶标抗体的反应速率,导致“沟状效应”发生,出现假阴性结果。

[0008] 生物素(biotin,B)分子量为 244.31,现已能人工合成,制备方便。生物素基本结构为双环结构:I环为咪唑酮环,是与亲和素结合的部位;II为噻吩环,含一个戊酸侧链,其末端羧基可与生物大分子连接,形成生物素标记抗原、抗体、酶等。生物素与生物大分子结合后并不影响生物分子和生物素原有的生物活性,即生物素标记抗体同时具备与亲和素和相应抗原结合之特性。

[0009] 链霉亲和素(streptavidin,SA),分子量65KD,由四条相同的肽链组成,一个链霉亲和素分子能结合四个生物素分子。与亲和素相比,链霉亲和素对生物素具有高度亲和力(亲和常数为 $10^{15}/\text{mol}$),与生物素结合后形成非常稳定复合物,很难解离。

发明内容

[0010] 本发明就是为了解决经典直接抗体包被模式固有缺陷,提供一种以生物素化牛血清白蛋白、链霉亲和素为主要原料,利用生物素与链霉亲和素相结合的特性,而提供一种液相抗原和抗体反应方式,缩短反应达到平衡所需时间的生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板。

[0011] 本发明是按以下技术方案实现的。

[0012] 一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板,包括聚苯乙烯酶标板,而在酶标板的每个微孔内分别包被有稀释比例为1:2850-3150的生物素化牛血清白蛋白和稀释比例为1:3800-4200的链霉亲和素;另将生物素化抗体0.1M磷酸盐缓冲盐水4℃液相保存作为反应试剂备用。

[0013] 所述一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板,其酶标板的每个微孔内分别包被有稀释比例为1:3000的生物素化牛血清白蛋白和稀释比例为1:4000的链霉亲和素;另将生物素化抗体0.1M磷酸盐缓冲盐水4℃液相保存作为反应试剂备用。

[0014] 所述一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,包括聚苯乙烯酶标板,而在聚苯乙烯酶标板每孔加入生物素化牛血清白蛋白与稀释液I按1:2850-3150比例稀释的生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液150μl,室温温浴16~18h,甩净包被缓冲液,用稀释液I洗酶标板2次,每次需静置10min,拍干;

每孔再加入链霉亲和素与稀释液II按1:3800-4200比例稀释的链霉亲和素包被缓冲液150μl,常温温浴2h,甩净包被缓冲液,用稀释液II洗酶标板2次,每次需静置10min,甩净稀释液II,最后每孔加入250μl封闭溶液,4℃温浴过夜,甩净封闭溶液,真空干燥至少6h,真空包装备用;

另将生物素化抗体0.1M磷酸盐缓冲盐水,4℃液相保存作为反应试剂备用。

[0015] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其稀释液I是由以下原料制备的,

三羟甲基氨基甲烷	5.76-6.36g
氯化钠	8.33-9.21g

Proclin 300 0.5ml

蒸馏水 950 ml

调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

[0016] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其稀释液 II 是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠 4.45-4.91g

磷酸氢二钠 6.8-7.52g

L- 色氨酸 2.09-2.1g

氯化钠 8.33-9.21 g

蒸馏水 950 ml

调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

[0017] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其封闭溶液是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠 0.138-0.152g

磷酸氢二钠 1.38-1.52g

6- 氨基己烷 1.43-1.57g

氯化钠 4.16-4.6g

蒸馏水 450 ml 调 pH=7.3~ 7.5

牛血清白蛋白 1.9-2.1g

蔗糖 16.63-18.37g

Procilin 300 0.25 ml

加蒸馏水 定溶至 500 ml。

[0018] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其生物素化抗体是将抗体与生物素以摩尔比为 20:1 的比例混合,室温搅拌 1h,将反应后的液体经 0.1M 磷酸盐缓冲盐水透析后 4°C 保存备用。

[0019] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其稀释液 I 是由以下原料制备的,

三羟甲基氨基甲烷 6.06 g

氯化钠 8.77 g

Proclin 300 0.5ml

蒸馏水 950 ml

调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

[0020] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其稀释液 II 是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠 4.68 g

磷酸氢二钠 7.16 g

L- 色氨酸 0.2 g

氯化钠 8.77 g

蒸馏水 950 ml

调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

[0021] 所述生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板的制备方法,其封闭溶液是由以下原料制备的,

磷酸二氢钠	0.145 g
磷酸氢二钠	1.45 g
6-氨基己烷	1.5 g
氯化钠	4.38 g
蒸馏水 450 ml 调 pH=7.3~7.5	
牛血清白蛋白	2.0 g
蔗糖	17.5 g
Procilin 300	0.25 ml
加蒸馏水	定溶至 500 ml。

[0022] 这样设计的本发明,由于链霉亲和素与生物素之间具有较高亲和力,确保酶标反应板具有很好稳定性。牛血清白蛋白分子来源丰富,价格低廉,且易于包被于酶标反应板,利用牛血清白蛋白分子空间效应,可增多固相材料反应面积,提高结合抗体分子数目,拓宽检测范围。

[0023] 生物素化抗体与待测抗原同时处于液相中,利于抗原抗体反应,使之迅速达到平衡。使用时,根据需要再加入相应生物素化捕获抗体,灵活方便;抗体分子置于液相中,能保留抗体分子原有空间构象,有效提高抗体利用效率,减少抗体用量,最大限度降低试剂盒成本。

附图说明

[0024] 图 1 是血清铁蛋白间接包被生物素化抗体及酶标抗体稀释浓度一组曲线图;
图 2 是血清铁蛋白间接包被生物素化抗体及酶标抗体稀释浓度二组曲线图;
图 3 是血清铁蛋白对照组直接包被捕获抗体及酶标抗体稀释浓度一组曲线图;
图 4 是血清铁蛋白对照组直接包被捕获抗体及酶标抗体稀释浓度二组曲线图;
图 5 是血清前列腺特异抗原间接包被生物素化抗体及酶标抗体稀释浓度一组曲线图;
图 6 是血清前列腺特异抗原间接包被生物素化抗体及酶标抗体稀释浓度二组曲线图;
图 7 是血清前列腺特异抗原对照组直接包被捕获抗体及酶标抗体稀释浓度一组曲线图;
图 8 是血清前列腺特异抗原对照组直接包被捕获抗体及酶标抗体稀释浓度二组曲线图。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图及实施例对本发明进行详细的说明。

[0026] 一. 材料:

1. 聚苯乙烯酶标板:市售美国 COSTAR 产品,96 孔可拆卸,酶联免疫吸附试验准用。

[0027] 2. 生物素化牛血清白蛋白:Sigma 公司产品,为牛血清白蛋白与生物素结合物。

[0028] 3. 链霉亲和素:Sigma 公司产品。

4. 牛血清白蛋白 :Sigma 公司产品。

二. 制备方法

1. 组分及配比

① 稀释液 I

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 6.06 g

氯化钠(NaCl) 8.77 g

Proclin 300 0.5ml

蒸馏水(D H₂O) 950 ml 调 pH=8.0 加 0.5 ml Procilin 300 定溶至 1000 ml。

[0029] ② 稀释液 II

磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ 2H₂O) 4.68 g

磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ 12H₂O) 7.16 g

L- 色氨酸(L-Tryptophan) 0.2 g

氯化钠(NaCl) 8.77 g

蒸馏水(D H₂O) 950 ml 调 pH=8.0 定溶至 1000 ml。

[0030] ③ 生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液

生物素化牛血清白蛋白与稀释液 I 按 1:2850-3150 比例稀释,终浓度为 5±0.25 μg/ml,充分搅拌混匀。

[0031] ④ 链霉亲和素包被缓冲液

链霉亲和素与稀释液 II 按 1:3800-4200 比例稀释,终浓度为 3±0.15 μg/ml,充分搅拌混匀。

[0032] ⑤ 封闭溶液

磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ 2H₂O) 0.145 g

磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ 12H₂O) 1.45 g

6- 氨基己烷(ACA) 1.5 g

氯化钠(NaCl) 4.38 g

蒸馏水(D H₂O) 450 ml 调 pH=7.3~ 7.5

牛血清白蛋白(BSA) 2.0 g

蔗糖 17.5 g

Procilin 300 0.25 ml

加蒸馏水(D H₂O) 定溶至 500 ml。

2. 具体步骤:

① 每孔加入生物素化牛血清白蛋白与稀释液 I 按 1:3000 比例稀释的的生物素化牛血清白蛋白包被缓冲液,体积 150μl,将微孔板放在密封的容器内,18~25℃,温浴 16~18h。

[0033] ② 甩净包被缓冲液,用稀释液 I 洗酶标板 2 次,300μl /well,每次需静置 10min。

[0034] ③ 甩净稀释液,并在干净的毛巾上拍干。

[0035] ④ 每孔加入链霉亲和素与稀释液 II 按 1:4000 比例稀释的链霉亲和素包被缓冲液,体积 150μl,将微孔板放在密封的容器内,18~25℃,温浴 2h。

[0036] ⑤ 甩净包被缓冲液,用稀释液 II 洗酶标板 2 次,300μl /well,每次需静置 10min。

[0037] ⑥ 重复③甩净稀释液,并在干净的毛巾上拍干。

[0038] ⑦ 每孔加入封闭溶液, 体积 250 μ l, 将微孔板放在密封的容器内, 4 $^{\circ}$ C 温浴过夜。

[0039] ⑧ 甩净封闭液, 并在干净的毛巾上拍干。将微孔板真空干燥至少 6h。取出后放置于干燥室及时真空包装。

[0040] 三. 临床应用情况

测定血清铁蛋白(Ferr):

(一) 试剂组成

1. 本发明酶标反应板
2. 生物素化抗铁蛋白单克隆抗体(捕获抗体)
3. 酶标记抗铁蛋白多克隆抗体(检测抗体)
4. 铁蛋白标准品(抗原)和质控血清
5. 洗涤缓冲液
6. 显色液 A 和显色液 B (酶底物)
7. 终止液(0. 2N H₂SO₄)

以上试剂除酶标反应板外, 具由沃克(天津) 生物科技有限公司生产的试剂盒本身提供。

[0041] (二) 检测方法 严格按沃克(天津) 生物科技有限公司试剂盒说明书操作。

[0042] 1. 准备:

①测试前将试剂盒组份置于室温(18-25 $^{\circ}$ C) 平衡 30 分钟, 测试后应立即放回 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

[0043] ②洗涤缓冲液为 10 倍浓缩, 用前用蒸馏水稀释至 200 ml。

[0044] ③如果铁蛋白浓度可能高于 1000ng/ml, 稀释后检测。

[0045] 2. 反应:

①取出本发明酶标反应板。

[0046] ②分别向孔中加入 50 μ l 铁蛋白标准品、质控血清、标本, 再分别加入 50 μ l 生物素化抗铁蛋白单克隆抗体, 震动 10-20 秒混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

[0047] ③扣除孔中液体, 用稀释后洗涤缓冲液洗涤 5 次, 在干净的纸巾或毛巾上拍干, 尽量去除残留液体。

[0048] ④每孔中加入 100 μ l 酶标记抗铁蛋白多克隆抗体, 震动 10-20 秒混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

[0049] ⑤重复步骤③。

[0050] ⑥每孔各加入 1 滴显色酶底物 A 和 B, 置于室温(18-25 $^{\circ}$ C) 避光显色 15 分钟。

[0051] ⑦每孔加入 1 滴终止液, 轻轻震动几次混匀。

[0052] ⑧在 15 分钟内, 以 630nm 作为参考波长, 测量 450nm 处的吸光度(A450)。

[0053] 2. 计算:

①以标准品的吸光度为 Y 轴, 浓度为 X 轴作图。

[0054] ②根据质控血清和标本的吸光度值, 从标准曲线上反算铁蛋白的浓度。

[0055] ③如果样品经过稀释, 在计算其浓度时应乘以相应的稀释倍数。

[0056] 3. 实验结果

①不同包被模式所得到标准曲线, 参照图 1-4。

[0057] 表 1 本发明间接包被生物素化抗体和标记抗体最佳浓度

生物素化抗体		1:4000		1:8000	
HRP标记抗体		1:6000	1:8000	1:6000	1:8000
铁蛋白抗原浓度 (ng/ml)	0	0.031	0.019	0.021	0.019
	20	0.314	0.233	0.224	0.19
	50	0.624	0.559	0.616	0.489
	100	1.021	0.956	1.021	0.892
	250	1.699	1.462	1.542	1.352
	500	2.015	1.859	1.894	1.784
	1000	2.261	2.016	2.010	1.987

表 2 直接包被模式捕获抗体和标记抗体最佳浓度

捕获抗体		1:1000		1:2000	
HRP标记抗体		1:1000	1:2000	1:1000	1:2000
铁蛋白抗原浓度 (ng/ml)	0	0.021	0.014	0.022	0.018
	20	0.541	0.206	0.216	0.181
	50	0.889	0.612	0.622	0.406
	100	1.257	0.85	0.921	0.725
	250	1.624	1.281	1.361	1.092
	500	1.818	1.637	1.808	1.401
	1000	2.201	1.920	2.012	1.695

② 精密度

表 3 精密度实验测定结果

组别	批内			批间		
	低浓度	中浓度	高浓度	低浓度	中浓度	高浓度
Con	7.89	57.1	268.2	7.96	57.3	260.2
SD	0.59	1.82	5.8	0.8	2.72	6.6
CV (%)	7.5	3.2	2.2	10.0	4.7	2.5

低浓度检测结果的变异系数不大于 10%，高浓度和中浓度检测结果的变异系数小于 5%，说明试验方法具有良好的重复性。

[0058] ③ 检测范围实验

将高值血清倍比稀释，用能准确测得点反算高值血清浓度，再将出现钩状效应之前的点作为本检测方法的最高检测值。经测定本方法检测范围为 0~1000ng/ml。

[0059] ④反应时间实验

表 4 间接包被模式反应时间确定

第一步反应时间 (min)		30		60	
第二步反应时间 (min)		30	60	30	60
铁蛋白抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.018	0.020	0.025	0.023
	20	0.237	0.245	0.235	0.241
	50	0.601	0.589	0.560	0.565
	100	0.976	0.989	0.965	0.973
	250	1.505	1.532	1.498	1.532
	500	1.898	1.903	1.901	1.900
	1000	2.106	2.132	2.132	2.145

表 5 直接包被模式反应时间确定

第一步反应时间 (min)		30		60	
第二步反应时间 (min)		30	60	30	60
铁蛋白抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.012	0.014	0.016	0.018
	20	0.145	0.165	0.198	0.234
	50	0.412	0.505	0.602	0.621
	100	0.678	0.787	0.856	0.863
	250	1.014	1.132	1.265	1.278
	500	1.323	1.498	1.608	1.645
	1000	1.565	1.732	1.848	1.943

4. 效果

①. 捕获抗体用量:由实验结果可知,在直接包被模式下,捕获抗体用量 1:1000 (8 微克 / 毫升)酶标抗体用量 1:2000 (2 微克 / 毫升);而采用本发明间接包被技术时,捕获抗体用量 1:4000 (2 微克 / 毫升)酶标抗体用量 1:8000 (0.5 微克 / 毫升),大大降低了捕获抗体和酶标抗体的用量,节约了成本。参照表 1、表 2。

[0060] ②. 检测范围:由结果可知,直接包被模式下的检测范围是 0~1000ng/ml,采用本发明间接包被技术降低了钩状效应的产生,在节约成本的前提下检测范围仍为 0~1000ng/ml。

[0061] 测定血清前列腺特异抗原 (PSA) :

(一) 试剂组成

1. 本发明酶标反应板

2. 生物素化抗 PSA 单克隆抗体(捕获抗体)
3. 酶标记抗 PSA 多克隆抗体(检测抗体)
4. PSA 标准品(抗原)和质控血清
5. 洗液(10 倍浓缩)
6. 显色液 A 和显色液 B(酶底物)
7. 终止液(0.2N H₂SO₄)

(二) 检测方法 严格按沃克(天津)生物科技有限公司试剂盒说明书操作

1. 准备:

①测试前将试剂盒组分置于室温(18-25℃)平衡 30 分钟,测试后应立即放回 2-8℃保存。

[0062] ②洗涤缓冲液为 10 倍浓缩,用前用蒸馏水稀释。

[0063] ③如果 PSA 浓度可能高于 100ng/ml,稀释后检测。

[0064] 2. 反应:

①取出本发明酶标反应板。

[0065] ②分别向孔中加入 50μl 铁蛋白标准品、质控血清、标本,再分别加入 50μl 生物素化抗 PSA 单克隆抗体,震动 10-20 秒混匀,37℃孵育 30 分钟。

[0066] ③扣除孔中液体,用稀释后洗涤缓冲液洗涤 5 次,在干净的纸巾或毛巾上拍干,尽量去除残留液体。

[0067] ④每孔中加入 100μl 酶标记抗 PSA 多克隆抗体,震动 10-20 秒混匀,37℃孵育 30 分钟。

[0068] ⑤重复步骤③。

[0069] ⑥每孔各加入 1 滴显色酶底物 A 和 B,置于室温(18-25℃)避光显色 15 分钟。

[0070] ⑦每孔加入 1 滴终止液,轻轻震动几次混匀。

[0071] ⑧在 15 分钟内,以 630nm 作为参考波长,测量 450nm 处的吸光度(A450)。

[0072] 2. 计算:

1. 以标准品的吸光度为 Y 轴,浓度为 X 轴作图。

[0073] 2. 根据质控血清和标本的吸光度值,从标准曲线上反算 PSA 的浓度。

[0074] 3. 如果样品经过稀释,在计算其浓度时应乘以相应的稀释倍数。

[0075] 3. 实验结果:

① 不同包被模式所得到标准曲线,参照图 5-8。

[0076]

表 6 间接包被生物素化抗体和标记抗体最佳浓度

生物素化抗体		1:4000		1:8000	
HRP 标记抗体		1:2500	1:5000	1:2500	1:5000
NSA 抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.024	0.019	0.020	0.018
	2	0.202	0.156	0.145	0.118
	10	0.643	0.562	0.505	0.452
	25	1.278	1.089	1.024	0.920
	50	1.767	1.576	1.423	1.390
	100	2.245	1.988	1.845	1.760

表 7 直接包被模式捕获抗体和标记抗体最佳浓度

捕获抗体		1:1000		1:2000	
HRP 标记抗体		1:1500	1:3000	1:1500	1:3000
NSA 抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.032	0.020	0.025	0.018
	2	0.298	0.223	0.198	0.145
	10	0.765	0.668	0.598	0.504
	25	1.369	1.289	1.203	1.089
	50	1.801	1.706	1.621	1.432
	100	2.232	2.010	1.832	1.745

② 精密度

表 8 精密度实验测定结果

组别	批内			批间		
	低浓度	中浓度	高浓度	低浓度	中浓度	高浓度
Con	2.45	21.64	74.37	2.34	21.13	74.14
SD	0.18	1.01	2.43	0.22	1.19	2.79
CV(%)	7.3	4.7	3.3	9.2	5.6	3.8

低浓度检测结果的变异系数不大于 10%，高浓度和中浓度检测结果的变异系数小于 5%，说明试验方法具有良好的重复性。

[0077] ③检测范围实验 将高值血清倍比稀释，用能准确测得点反算高值血清浓度，再将出现钩状效应之前的点作为本检测方法的最高检测值。经测定本方法检测范围为 0~100ng/ml。

[0078] ④反应时间实验

表 9 间接包被模式反应时间确定

第一步反应时间 (min)		30		60	
第二步反应时间 (min)		30	60	30	60
PSA 抗原浓度 (ng/ml)	0	0.018	0.020	0.022	0.019
	2	0.155	0.178	0.174	0.167
	10	0.553	0.598	0.601	0.577
	25	1.086	1.132	1.157	1.145
	50	1.598	1.610	1.678	1.632
	100	1.987	2.012	2.011	1.965

表 10 直接包被模式反应时间确定

第一步反应时间 (min)		30		60	
第二步反应时间 (min)		30	60	30	60
PSA 抗原浓度 (ng/ml)	0	0.023	0.019	0.025	0.023
	2	0.237	0.245	0.235	0.241
	10	0.661	0.689	0.664	0.665
	25	1.287	1.289	1.265	1.273
	50	1.721	1.732	1.798	1.745
	100	1.989	2.013	2.121	1.998

以上结果表明,直接包被模式和间接包被模式第一步与第二步反应时间均为 30min。

[0079] 4. 效果

① 捕获抗体用量 由实验结果可知,在普通直接包被模式下,捕获抗体用量 1:1000,酶标抗体用量 1:3000;而采用本发明间接包被技术时,捕获抗体用量 1:4000,酶标抗体用量 1:5000,大大降低了捕获抗体和酶标抗体的用量,节约了成本。

[0080] ② 检测范围 由结果可知,普通的直接包被模式下的检测范围是 0~100ng/ml;采用本发明间接包被技术降低了钩状效应的产生,在节约成本的前提下检测范围仍为 0~100ng/ml。

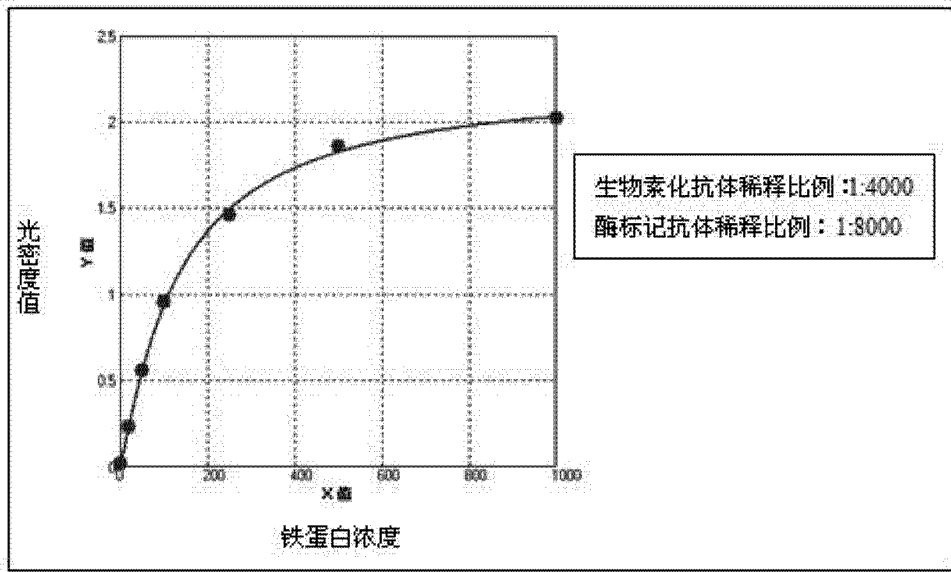


图 1

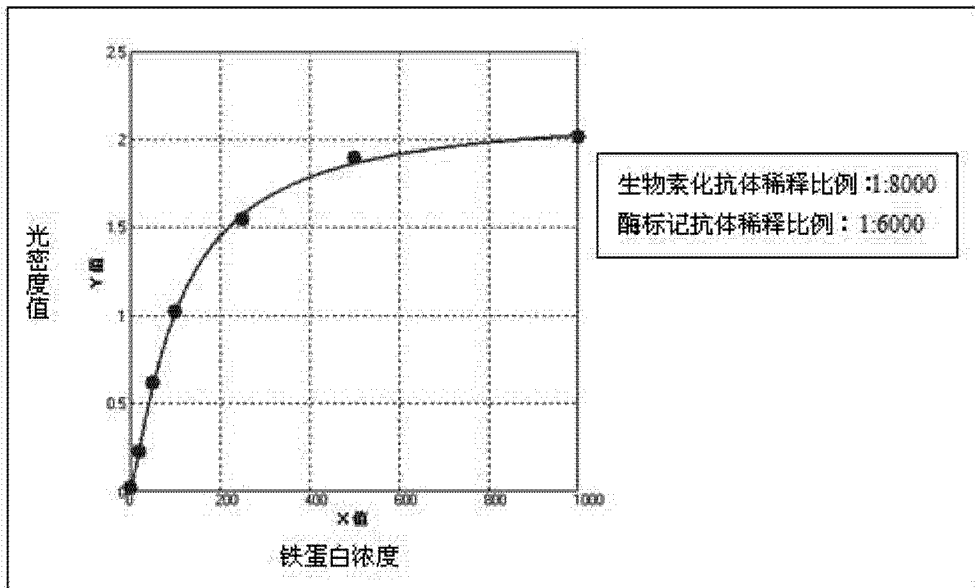


图 2

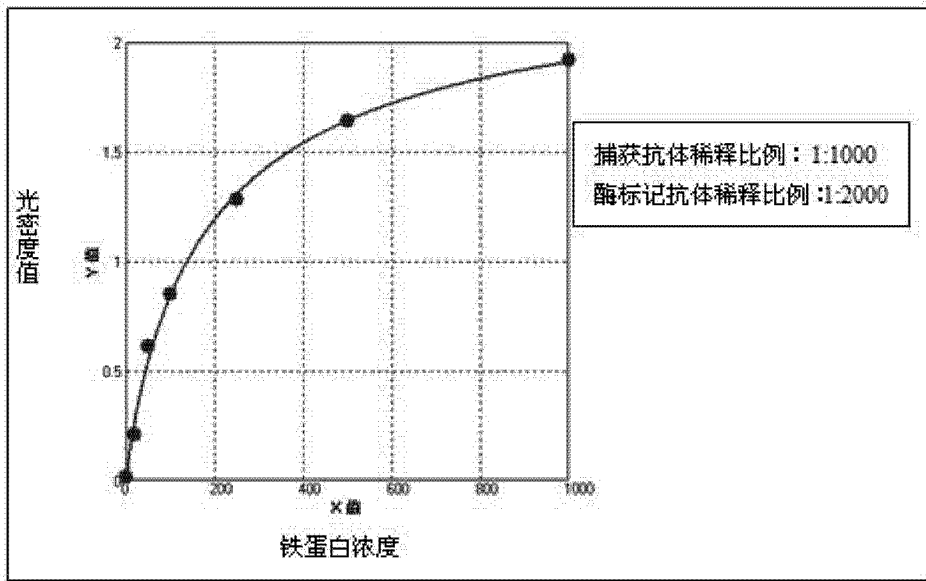


图 3

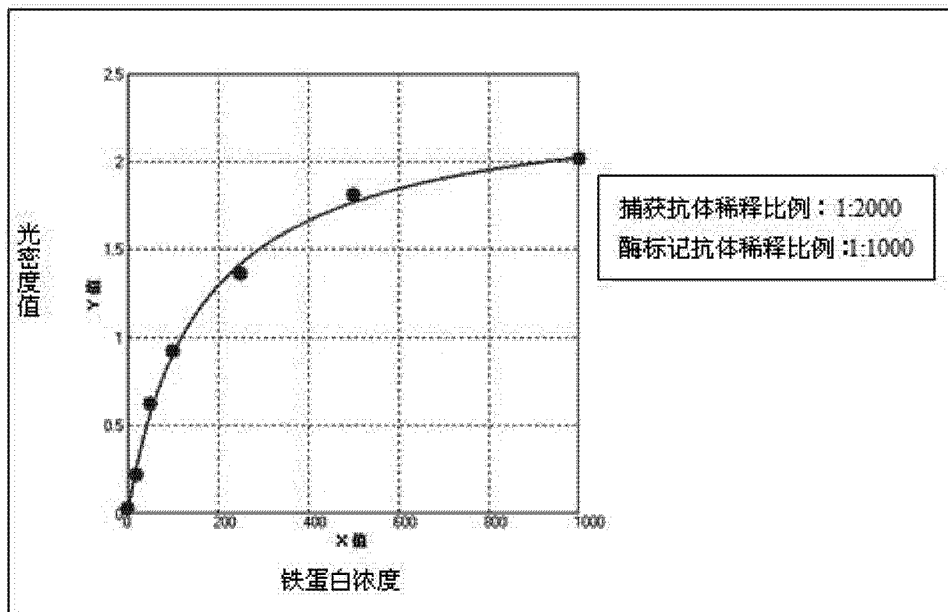


图 4

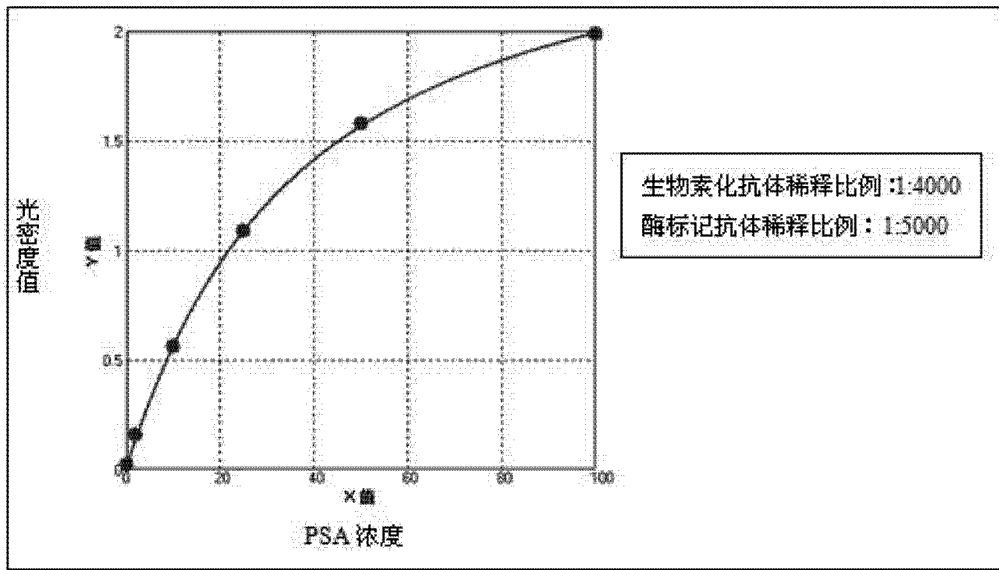


图 5

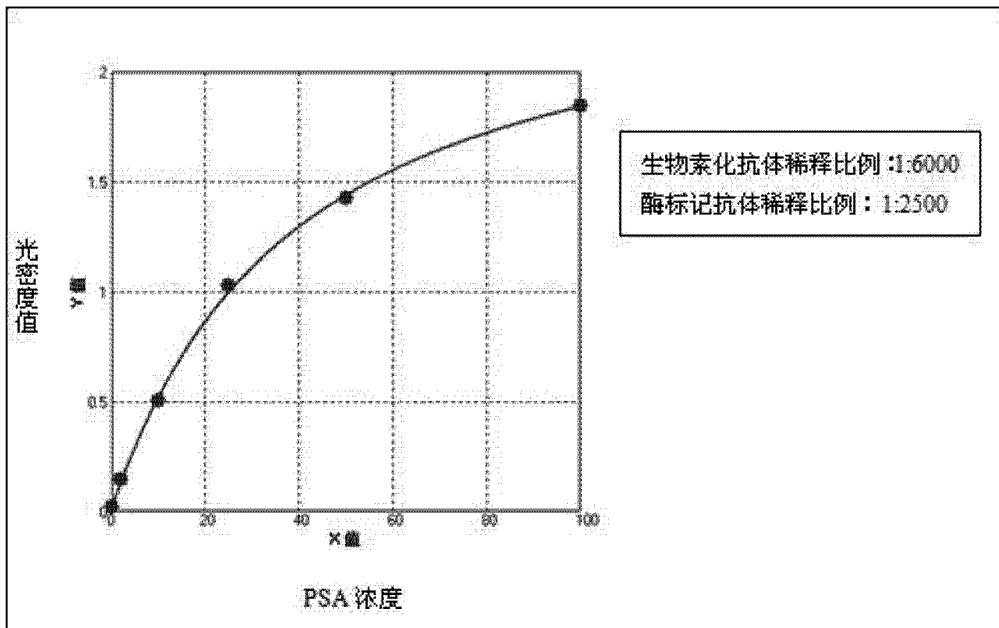


图 6

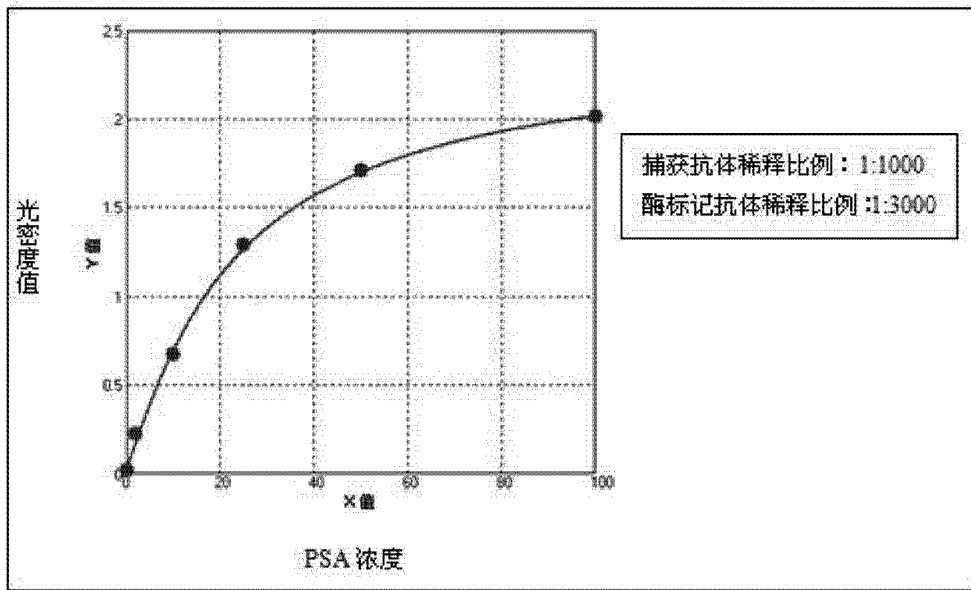


图 7

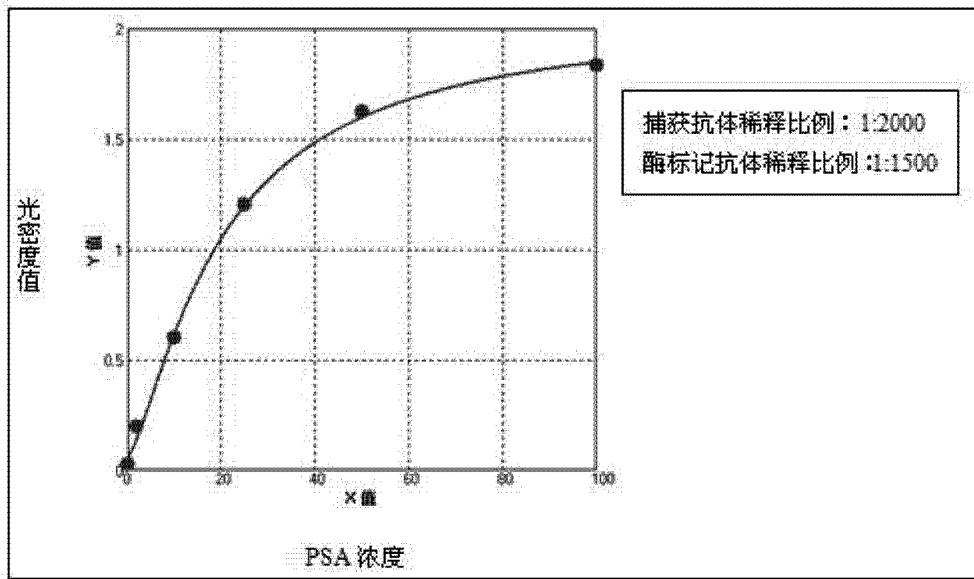


图 8

专利名称(译)	生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板及其制备方法		
公开(公告)号	CN102207501A	公开(公告)日	2011-10-05
申请号	CN201110068782.9	申请日	2011-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	王洪 李会强 杨静 苑凤君 刘志勇		
发明人	王洪 李会强 杨静 苑凤君 刘志勇		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素酶标反应板及其制备方法，属于检验医学中标记免疫分析技术。本发明包括聚苯乙烯酶标板，而在每个微孔内分别包被有生物素化牛血清白蛋白和链霉亲和素；另将生物素化抗体液相保存作为反应试剂备用。检测时，将生物素化抗体与待测抗原同时加入到本发明酶标反应板上，生物素化抗体与待测抗原反应同时，生物素分子与链霉亲和素结合被固定在固相材料表面。本发明将待测抗原与生物素化抗体置于液相中，可提高反应速率，拓宽铁蛋白检测范围，减少双抗体夹心试验中的“钩状效应”。酶标反应灵敏度、准确度、精密度等指标均符合技术要求。提高包被抗体利用效率，减少抗体用量，大幅度降低试剂盒成本。

