



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105203747 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201510606548.5

审查员 周露露

(22)申请日 2015.09.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105203747 A

(43)申请公布日 2015.12.30

(73)专利权人 宁波瑞源生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市江北区高新产
业园皇吉浦路288号

(72)发明人 李松羊 张闻 王建飞 周海滨

(74)专利代理机构 宁波市鄞州盛飞专利代理事

务所(普通合伙) 33243

代理人 张向飞

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法

(57)摘要

本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,包括对荧光粒子的清洗、活化、交联、封闭以及保存,其中,封闭包括先后顺次进行的精氨酸封闭和BSA封闭;精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬,精氨酸以离子键或者共价键键合到荧光粒子;BSA封闭为将精氨酸封闭后的荧光微粒以BSA溶液重悬,BSA以离子键或者共价键键合到荧光粒子;得到封闭后的荧光粒子。本发明通过精氨酸对荧光粒子的封闭,使荧光粒子上多余的或者未结合的区域被精氨酸占据,促使血清中的离子、免疫复合物、蛋白质等不与荧光粒子非特异性吸附,同时也降低了荧光粒子本身与膜的非特异性吸附,降低了检测信号值,减少了假阳性信号。

1. 一种精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,其特征在于:包括对荧光粒子的清洗、活化、交联、封闭以及保存,

其中,封闭包括先后顺次进行的精氨酸封闭和BSA封闭;

所述精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬,精氨酸以离子键或者共价键键合到荧光粒子,所述荧光粒子以精氨酸溶液重悬为将添加了荧光粒子的精氨酸溶液在50-80℃震荡20-60min;

所述BSA封闭为将精氨酸封闭后的荧光微粒以BSA溶液重悬,BSA以离子键或者共价键键合到荧光粒子,所述荧光粒子以BSA溶液重悬为将添加了荧光粒子的BSA溶液在50-80℃震荡20-60min;

得到封闭后的荧光粒子。

2. 根据权利要求1所述的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,其特征在于:所述精氨酸封闭时精氨酸溶液浓度为1-5.0M。

3. 根据权利要求1所述的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,其特征在于:所述BSA封闭时BSA溶液的浓度为0.5-5wt%。

4. 根据权利要求1所述的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,其特征在于:所述封闭还包括对经精氨酸封闭和BSA封闭后的荧光粒子的清洗,清洗为将封闭后的荧光粒子经离心分离得到沉淀后,将沉淀以PBST缓冲液超声清洗至少一次。

5. 根据权利要求4所述的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,其特征在于:所述离心分离为在2-8℃下离心20-60min得到沉淀。

6. 根据权利要求4所述的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,其特征在于:所述PBST缓冲液的组成包括6-200mMPBS和0.01-0.1wt% tween20。

一种精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法

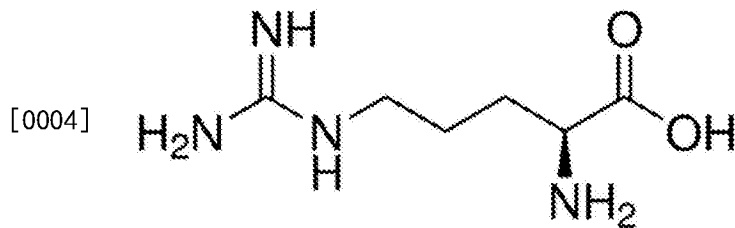
技术领域

[0001] 本发明涉及一种用抗体特异性检测抗原的制备方法,特别是一种精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法。

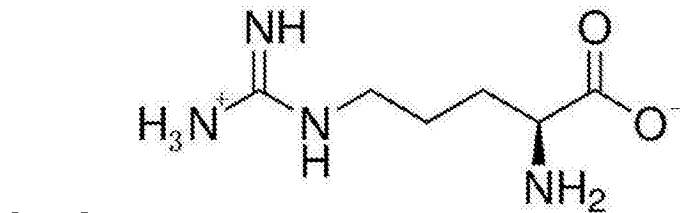
背景技术

[0002] 在抗原抗体的免疫反应中,标记抗体都会存在各种不同的非特异性吸附。这些非特异性吸附中,有些通过抗干扰试剂处理来解决,但是有很多需要对标记抗体的标记后处理来解决。

[0003] 精氨酸分子结构式如下:



[0005] 精氨酸离子结构式如下:



发明内容

[0007] 为解决上述问题,本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,通过精氨酸对荧光粒子进行进一步的标记,可以进一步地降低检测时非特异性因素的干扰,从而达到降低背景信号,提高检测性能,增强灵敏度的目的。

[0008] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法,包括对荧光粒子(含有荧光素的胶乳微球或者其他的胶乳微球以及其他的微球,其直径在10nm到1mm之间不等,均可以适用本发明技术方案)的清洗、活化、交联、封闭以及保存,

[0009] 其中,封闭包括精氨酸封闭和BSA封闭;

[0010] 所述精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬,精氨酸以离子键或者共价键键合到荧光粒子上;

[0011] 所述BSA封闭为将荧光微粒以BSA溶液重悬,BSA以离子键或者共价键键合到荧光粒子上;

[0012] 得到封闭后的荧光粒子。

[0013] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,精氨酸封闭时精氨酸溶液浓度为1-5.0M。溶剂为PBS缓冲液,pH6.8-8.5。

[0014] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,荧光粒子以精氨酸溶液重悬为将添加荧光粒子的精氨酸溶液在50-80℃震荡20-60min。

[0015] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,BSA封闭时BSA溶液的浓度为0.5-5wt%。溶剂为PBS缓冲液pH6.8-8.5。

[0016] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,荧光粒子以BSA溶液重悬为将添加荧光粒子的BSA溶液在50-80℃震荡20-60min。

[0017] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,封闭还包括对经精氨酸封闭和BSA封闭后的荧光粒子的清洗,清洗为将封闭后的荧光粒子经离心分离得到沉淀后,将沉淀以PBST缓冲液超声清洗至少一次。

[0018] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,离心分离为在2-8℃下离心20-60min得到沉淀。

[0019] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法的一种改进,PBST缓冲液的组成包括6-200mM PBS和0.01-0.10wt% tween20。其pH值为7.0-8.5。

[0020] 本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法中清洗、活化、交联以及保存均可以采用现有的任何技术方案来进行实施例,以下的实施方案仅仅为对相应清洗、活化、交联以及保存与本发明封闭方法相结合的技术方案的一种说明,而并不代表对本发明技术方案保护范围的限定:

[0021] 1、荧光粒子清洗:

[0022] 用10mM Mes缓冲液清洗适量荧光粒子,然后在4℃,15000rpm离心30min,吸去上清液;沉淀再加入500μl Mes缓冲液中,超声2min,再次离心,去除上清液。同前述操作依次清洗3次。

[0023] 具体操作步骤如下:

[0024] 取3mg羧基荧光微球(3mg 200nm flash red),分散于适量10mM Mes缓冲液,4℃下15000rpm离心30min,去上清液→沉淀中加0.5ml Mes缓冲液,4℃下15000rpm离心30min,去上清液→用Mes缓冲液溶解沉淀,超声2min,4℃下15000rpm离心30min,去上清液→用Mes缓冲液溶解沉淀,超声2min,4℃下15000rpm离心30min,去上清液,取沉淀,加入0.5ml Mes缓冲液溶解,超声2min,即可得到清洗完成的荧光粒子。

[0025] 2、活化

[0026] ①取清洗后的荧光粒子3mg,加入300μl Mes缓冲液,超声6min,

[0027] ②依次加入50μl EDC(50mg/ml),50μl NHS(50mg/ml),

[0028] ③混匀,在室温震荡避光反应30min,得到活化后的荧光粒子。

[0029] 3、交联

[0030] ①取活化后的荧光粒子3mg,在Mes缓冲液溶解,4℃下15000rpm离心60min,去上清液,取沉淀物,

- [0031] ②沉淀物用PBS(pH7.4)清洗后,4℃下15000rpm离心30min,去上清液,取沉淀物,
- [0032] ③沉淀物中加入0.5ml PBS缓冲液,超声6min,
- [0033] ④再加500μg PCT抗体(用PH7.4的PBS溶解,),混匀,
- [0034] ⑤于37℃避光震荡反应4h;
- [0035] ⑥4℃下15000rpm离心30min,去上清液,取沉淀物,得到交联后的荧光粒子。
- [0036] 4、封闭
- [0037] ①将交联后的荧光粒子,用含1.0M精氨酸溶液(以pH7.4的PBS缓冲液溶解)重悬,60℃震荡反应30min,
- [0038] ②再用含1%的BSA溶液(以pH7.4的PBS缓冲液溶解)重悬,60℃震荡反应30min,4℃下15000rpm离心30min,去上清液,取沉淀物,
- [0039] ③沉淀物用PBST缓冲液(PH7.4,10mMPBS 0.05% tween20)溶解分散、超声清洗、离心三次,得到封闭后的荧光粒子
- [0040] 5、保存
- [0041] 封闭后的荧光粒子用50mM Tris(1%酪蛋白,0.5%BSA,0.05%TW20,10mM EDTA,3%PEG,0.1%NaN₃,pH8.0)溶解成10mg/ml溶液保存。
- [0042] 本发明方案是用精氨酸在标记抗体荧光粒子做后处理后,可以减少血清中的非特异性吸附,并降低血清中的0值的本底信号(背景信号),增加灵敏度,去除假阳性标本。通过对标记抗体荧光粒子的后处理,精氨酸通过共价键或者离子键作用结合到标记的荧光粒子上,以封闭抗体交联荧光粒子后,荧光粒子上多余的或者未结合的区域被精氨酸占据,促使血清中的离子、免疫复合物、蛋白质等不与荧光粒子非特异性吸附,同时也降低了荧光粒子本身与膜的非特异性吸附,降低了检测信号值,减少了假阳性信号。

具体实施方式

[0043] 下面结合具体实施方式,进一步阐明本发明,应理解下述具体实施方式仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0044] 本发明技术方案中对荧光粒子的清洗、活化、交联以及保存均可以采用现有的技术方案(故而在具体的实施例中予以省略而不做限定),以下实施例所示均表示为相应的封闭方案与现有技术方案结合后形成完整的技术方案而得到标记抗体荧光粒子。

[0045] 实施例1

[0046] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为1.0M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在60℃震荡反应30min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为1%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在60℃震荡反应30min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。

[0047] 对比例

[0048] 本对比例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子采用BSA封闭,其中荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为1%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在60℃震荡反应30min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。

[0049] 实施例1和对比例得到的荧光粒子样品分别经配制成检测试剂盒,后测试得到如表一和表二所示结果:

[0050] PCT校准品浓度梯度:0,0.05,0.1,0.39,1.56,6.25,25,50,100ng/ml。校准品溶液配方:100mM PBS-BSA-NaN₃(pH7.4,2.0%BSA,0.1%NaN₃)。校准品加入量:50 μ l。

[0051] PCT包被抗体浓度:5mg/ml。包被抗体溶液:100mM PBS-NaN₃(pH7.4,0.1%NaN₃)。用PCT包被抗体划膜,然后烘干保存过夜后备用。在膜两头分别重叠接触式贴上吸水纸和样品垫后,用切割机分别切割成0.4cm宽的试纸条,装入卡壳内室温干燥备用。

[0052] PCT标记抗体荧光粒子浓度:0.05mg/ml。标记抗体荧光粒子溶液:50mM Tris(1%酪蛋白,0.5%BSA,0.05%Tw20,10mM EDTA,3%PEG,0.1%NaN₃,pH8.0)。PCT标记抗体荧光粒子加入量:50 μ l。

[0053] 反应10min后,用荧光免疫定量分析仪检测信号。

[0054] 表一

PCT 校准曲线数据	
Calibrator	信号值
ng/ml	RLU
100	40733
50	29356
25	19866
6.25	7400
1.56	2454
0.39	619
0.1	214
0.05	182
0	29

[0056] 表二精氨酸对标记抗体荧光粒子的后处理效果

标记抗体荧光粒子				
血清		对比例	实施例 1	信号值下降幅度
编号	ng/ml	RLU	RLU	%
1	0	6216	623	89.98
2	0	5664	675	88.08
3	0	6948	655	90.57
4	0	2432	308	87.34
5	0	3874	489	87.38
6	0	1620	79	95.12
7	0	4951	558	88.73
8	0	753	38	94.95
9	0	2008	175	91.28
10	0	3290	255	92.25

[0057] 从表一和表二数据可以看出,在精氨酸对标记抗体荧光粒子处理后,所有0值血清的检测信号都在1000以下,对照校准曲线,检测值在1.56ng/ml以下,比较接近于0值。而在常规处理时,所有0值血清的信号值在753到7000之间,即检测值在0.4ng/ml到6.25ng/ml之间,相对于原信号值,检测信号值下降了90%左右(88%到95%之间),能显著降低非特异性信号。

[0058] 鉴于本发明方案实施例众多,各实施例实验数据庞大众多,不适合于此处逐一列举说明,但是各实施例所需要验证的内容和得到的最终结论均接近,故而此处不对各个实施例的验证内容进行逐一说明,仅以实施例1作为代表说明本发明申请优异之处。

[0059] 实施例2

[0060] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为1.3M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在50℃震荡反应20min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为3.7%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在63℃震荡反应60min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。重悬是溶液的pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8以及7.0-8.5范围内的其它任意值。

[0061] 实施例3

[0062] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为2.0M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在70℃震荡反应40min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为2.3%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在56℃震荡反应20min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。重悬是溶液的pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8以及7.0-8.5范围内的其它任意值。

[0063] 实施例4

[0064] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其

中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为3.0M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在80℃震荡反应50min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为1.2%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在72℃震荡反应38min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。重悬是溶液的pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8以及7.0-8.5范围内的其它任意值。

[0066] 实施例5

[0067] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为4M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在67℃震荡反应57min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为0.5%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在55℃震荡反应45min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。重悬是溶液的pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8以及7.0-8.5范围内的其它任意值。

[0068] 实施例6

[0069] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为5M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在72℃震荡反应33min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为4%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在53℃震荡反应29min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。重悬是溶液的pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8以及7.0-8.5范围内的其它任意值。

[0070] 实施例7

[0071] 本实施例中对荧光粒子的封闭为将荧光粒子顺次采用精氨酸封闭和BSA封闭,其中精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬后,再以BSA溶液重悬封闭即可得到封闭后的荧光粒子。其中,荧光粒子以精氨酸溶液重悬时,精氨酸溶液为2.7M的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在65℃震荡反应37min;精氨酸封闭后的荧光粒子以BSA溶液重悬时,BSA溶液为5%的PBS缓冲液溶液,溶液为pH7.4,重悬是在66℃震荡反应48min,而后经清洗、离心分离后得到封闭后的荧光粒子样品。重悬是溶液的pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8以及7.0-8.5范围内的其它任意值。

[0072] 与以上实施例相区别地,重悬封闭完成后清洗为采用PBST缓冲液中进行超声清洗三次,其中PBST缓冲液的组成为10mM PBS和0.05% tween20,其pH值为7.4(PBST缓冲液的组成还可以为以下任一:6mM PBS和0.07% tween20;9mM PBS和0.03% tween20;12mM PBS和0.08% tween20;20mM PBS和0.06% tween20;16mM PBS和0.04% tween20;120mM PBS和0.01% tween20;200mM PBS和0.1% tween20;180mM PBS和0.03% tween20;140mM PBS和0.09% tween20;160mM PBS和0.075% tween20;150mM PBS和0.063% tween20;40mM PBS和0.055% tween20;60mM PBS和0.036% tween20;90mM PBS和0.016% tween20。pH值还可以为7.0、7.2、7.3、7.5、7.6、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5以及7.0-8.5范围内的其它任意值)。超声波清洗的次数还可以为一次或者两次或者四次。清洗后离心分离为在4℃(离心

分离的温度还可以为2℃、3℃、5℃、6℃、7℃、8℃以及2-8℃范围内的其它任意值)下离心30min(离心时间还可以为20min、22min、27min、33min、36min、40min、44min、46min、48min、50min、55min、59min、60min以及20-60min范围内的其它任意值)。

[0073] 本处实施例对本发明要求保护的技术范围中点值未穷尽之处以及在实施例技术方案中对单个或者多个技术特征的同等替换所形成的新的技术方案,同样都在本发明要求保护的范围内;同时本发明方案所有列举或者未列举的实施例中,在同一实施例中的各个参数仅仅表示其技术方案的一个实例(即一种可行性方案),而各个参数之间并不存在严格的配合与限定关系,其中各参数在不违背公理以及本发明述求时可以相互替换,特别声明的除外。

[0074] 本发明方案所公开的技术手段不仅限于上述技术手段所公开的技术手段,还包括由以上技术特征任意组合所组成的技术方案。以上所述是本发明的具体实施方式,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,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法		
公开(公告)号	CN105203747B	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201510606548.5	申请日	2015-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	宁波瑞源生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	宁波瑞源生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宁波瑞源生物科技有限公司		
[标]发明人	李松羊 张闻 王建飞 周海滨		
发明人	李松羊 张闻 王建飞 周海滨		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	张向飞		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN105203747A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开的精氨酸对标记抗体荧光粒子的封闭方法，包括对荧光粒子的清洗、活化、交联、封闭以及保存，其中，封闭包括先后顺次进行的精氨酸封闭和BSA封闭；精氨酸封闭为将荧光粒子以精氨酸溶液重悬，精氨酸以离子键或者共价键键合到荧光粒子；BSA封闭为将精氨酸封闭后的荧光微粒以BSA溶液重悬，BSA以离子键或者共价键键合到荧光粒子；得到封闭后的荧光粒子。本发明通过精氨酸对荧光粒子的封闭，使荧光粒子上多余的或者未结合的区域被精氨酸占据，促使血清中的离子、免疫复合物、蛋白质等不与荧光粒子非特异性吸附，同时也降低了荧光粒子本身与膜的非特异性吸附，降低了检测信号值，减少了假阳性信号。

