



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101936987 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010285031. 8

(22) 申请日 2010. 09. 16

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 周雷激 赵征寰

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01J 1/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法

(57) 摘要

基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法。涉及免疫检测方法,提供一种能够实现氨基微珠上抗体分子定向偶联的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法。包括以下步骤:用桥联试剂对氨基微珠表面进行处理,将蛋白 A 偶联到氨基微珠上,再与 AFP 抗体 1 进行孵育,得抗体固定化微珠;将抗体固定化微珠与人血清样品进行孵育,结合了抗原 AFP 的抗体固定化微珠与 AFP 抗体 2 进行孵育,FITC 标记的能够识别 AFP 抗体 2 的二抗与抗体固定化微珠进行孵育,检测荧光强度,即得人血清样品中的 AFP。

1. 基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,包括以下步骤:
 - 1) 用桥联试剂对氨基微珠表面进行处理,再将蛋白 A 在缓冲液中偶联到氨基微珠上;
 - 2) 将偶联了蛋白 A 的氨基微珠与 AFP 抗体 1 进行孵育,得抗体固定化微珠;
 - 3) 将抗体固定化微珠与人血清样品进行孵育,使抗体固定化微珠特异性识别人血清样品中的抗原 AFP,得结合了抗原 AFP 的抗体固定化微珠;
 - 4) 将结合了抗原 AFP 的抗体固定化微珠与 AFP 抗体 2 进行孵育,使抗原 AFP 与 AFP 抗体 2 结合,得处理后的抗体固定化微珠;
 - 5) 将 FITC 标记的能够识别 AFP 抗体 2 的二抗与步骤 4) 所得的处理后的抗体固定化微珠进行孵育,检测荧光强度,即得人血清样品中的 AFP,完成基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析。
2. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 1) 中,所述桥联试剂为戊二醛溶液,所述戊二醛溶液的体积比浓度为 5%~15%。
3. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 1) 中,所述处理的条件为温度 25~40°C,时间 1~3h;所述偶联的缓冲液为常规 PBS 溶液,所述偶联的温度为 25~40°C,偶联的时间为 1~3h。
4. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 1) 进行偶联前,用硼氢化钠对桥联试剂处理后的氨基微珠进行再次处理,再次处理条件为:将氨基微珠浸入 6%的硼氢化钠水溶液中 1h。
5. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 2) 中,所述孵育的温度为 4~20°C,孵育的时间为 5~28h;所述 AFP 抗体 1 为鼠抗人 AFP 抗体。
6. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 3) 中,所述孵育的温度为 37°C,孵育的时间为 1~3h。
7. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 3) 中进行孵育前,将步骤 2) 所得抗体固定化微珠进行如下处理:

用含 30mol/L 二甲基庚二酸亚胺脂-二盐酸化物的硼酸缓冲液对微珠进行处理 2 次,每次 45min,最后用含有乙醇胺的硼酸缓冲液终止反应。
8. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 4) 中,所述孵育的温度为 37°C,孵育的时间为 2~5h;所述 AFP 抗体 2 为兔抗人 AFP 抗体。
9. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 5) 中,所述孵育的温度为 4~10°C,孵育的时间为 1~3h。
10. 如权利要求 1 所述的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法,其特征在于:在步骤 5) 中,进行孵育前使用胃蛋白酶将 FITC 标记的能够识别 AFP 抗体 2 的二抗进行酶切;所述能够识别 AFP 抗体 2 的二抗为羊抗兔抗体。

基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测方法,特别涉及一种基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法。

背景技术

[0002] 蛋白 A 是葡萄球菌蛋白 A(staphylococcus protein A, SPA) 的简称,是一种从金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 细胞壁中分离的蛋白质。蛋白 A 主要有 5 个结合抗体的功能域,每个结构域大约由 58 个氨基酸残基组成 (1、Karen L. A, Julia D. B, Emily S. S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation, Molecular Immunology, 2008, 45: 1600-1611; 2、逢少蕉, 梁浩, 宋淑亮, 葡萄球菌蛋白 A 活性机制与现代应用, 生命的化学, 2008, 28 卷第 6 期, 748-751)。

[0003] 现有的双抗夹心法存在的主要缺陷在于: 在抗体偶联过程中, 由于抗体的倒伏, 造成抗体分子的失活, 从而使其无法对抗原进行正确的识别。蛋白 A 可以与抗体的 Fc 端特异性结合, 这种结合不会影响抗体的活性, 且能使抗体分子识别抗原的区域 F(ab) 端暴露出来, 使抗体的活性能够得到较好的保持, 有利于后续的检测。蛋白 A 与抗体 Fc 端的结合没有选择性, 导致其能与信号分子 FITC (fluorescein isothiocyanate) 标记的抗体直接结合, 从而导致假阳性的出现。利用酶切技术及荧光标记技术对信号分子 FITC 进行处理, 切去抗体的 Fc 端并标记上 FITC, 从而降低检测中的背景荧光 (3、Brogan K L, Wolfe K N, Jones PA, et al. Directional immobilization of F(ab')₂ antibody fragments on gold. Analytica Chimica Acta, 2003, 496(1-2): 73-80; 4、Sjödahl J. Repetitive Sequences in Protein A from Staphylococcus aureus. Arrangement of Five Regions within the Protein, Four being Highly Homologous and Fc-Binding. European Journal of Biochemistry, 1977, 73(2): 343-351; 5、Hüseyin A, Nilay B, Zübeyde B. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethylmethacrylate) cryogel, Biochemical Engineering Journal, 2009, 45: 201-208)。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种能够实现氨基微珠上抗体分子定向偶联的基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法。

[0005] 所述基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法包括以下步骤:

[0006] 1) 用桥联试剂对氨基微珠表面进行处理, 再将蛋白 A 在缓冲液中偶联到氨基微珠上;

[0007] 2) 将偶联了蛋白 A 的氨基微珠与 AFP (alpha fetoprotein, 甲胎蛋白) 抗体 1 进行孵育, 得抗体固定化微珠;

[0008] 3) 将抗体固定化微珠与人血清样品进行孵育, 使抗体固定化微珠特异性识别人血

清样品中的抗原 AFP,得结合了抗原 AFP 的抗体固定化微珠;

[0009] 4) 将结合了抗原 AFP 的抗体固定化微珠与 AFP 抗体 2 进行孵育,使抗原 AFP 与 AFP 抗体 2 结合,得处理后的抗体固定化微珠;

[0010] 5) 将 FITC 标记的能够识别 AFP 抗体 2 的二抗与步骤 4) 所得的处理后的抗体固定化微珠进行孵育,检测荧光强度,即得人血清样品中的 AFP,完成基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析。

[0011] 在步骤 1) 中,所述桥联试剂可采用戊二醛溶液等,所述戊二醛溶液的体积比浓度可为 5%~15%;所述处理的条件为温度 25~40℃,时间 1~3h;所述缓冲液可采用常规 PBS 溶液等,所述偶联的温度可为 25~40℃,偶联的时间可为 1~3h;

[0012] 在进行偶联前,还可用硼氢化钠对桥联试剂处理后的氨基微珠进行再次处理,再次处理条件为:将氨基微珠浸入 6%的硼氢化钠水溶液中 1h。

[0013] 在步骤 2) 中,所述孵育的温度可为 4~20℃,孵育的时间可为 5~28h;所述 AFP 抗体 1 可为鼠抗人 AFP 抗体。

[0014] 在步骤 3) 中,所述孵育的温度可为 37℃,孵育的时间可为 1~3h;进行孵育前还可将步骤 2) 所得抗体固定化微珠进行如下处理:

[0015] 用含 30mol/L DMP(二甲基庚二酸亚胺脂——二盐酸化物)的硼酸缓冲液对微珠进行处理 2 次,每次 45min,最后用含有乙醇胺的硼酸缓冲液终止反应。

[0016] 在步骤 4) 中,所述孵育的温度可为 37℃,孵育的时间可为 2~5h;所述 AFP 抗体 2 可为兔抗人 AFP 抗体;

[0017] 在步骤 5) 中,所述孵育的温度为 4~10℃,孵育的时间为 1~3h;进行孵育前还可使用胃蛋白酶将 FITC 标记的能够识别 AFP 抗体 2 的二抗进行酶切;所述能够识别 AFP 抗体 2 的二抗可为羊抗兔抗体。

[0018] 本发明所述基于蛋白 A 固定化抗体的微珠免疫分析方法与现有双抗夹心方法相比,具有诸多优势。首先,现有双抗夹心方法在固定抗体过程中可能导致抗体的倒伏,使抗体识别抗原的 F(ab) 端功能域被掩盖,无法正常识别抗原,降低了氨基微珠识别抗原的能力。而本发明基于蛋白 A 特异性识别抗体 Fc 端的特性,能够使抗体的 F(ab) 端功能域完全暴露出来,使检测效果得到显著改善。同时,通过使用胃蛋白酶对识别抗原的第二个抗体进行切割,再用 FITC 对切割后的抗体进行标记,将其作为信号分子来降低检测背景。由于胃蛋白酶的切割会切去抗体 Fc 端,相当于将荧光标记抗体与蛋白 A 结合的位点切除,理论上荧光标记抗体就不可能直接偶联到微珠上,降低了非特异性吸附,避免了假阳性的出现,提高了检测的精确度。

附图说明

[0019] 图 1 为不同浓度 AFP 的检测曲线。在图 1 中,横坐标为人血清样品通过计算得到的 AFP 浓度 (ng/ml),纵坐标为流式细胞仪测出的荧光强度;拟合曲线函数为 $F(x) = 1312.13 + 2.089X$,相关系数 (R^2) 达到了 0.9967。

[0020] 图 2 为 FITC 标记荧光光谱图,在图 2 中,横坐标为波长 (nm),纵坐标为荧光信号值;曲线 1 为未切割的 FITC 标记的抗体,购自北京中衫金桥;曲线 2 为切割后的 FITC 标记的抗体(胃蛋白酶切割购自北京中衫金桥的 FITC 标记的抗体即得);曲线 3 为去离子水。

[0021] 图 3 为 FITC 标记紫外吸收光谱图,在图 3 中,横坐标为激发光的波长 (nm),纵坐标为紫外分光光度计测出的信号值 A;曲线 1 为未切割的 FITC 标记的抗体,购自北京中衫金桥;曲线 2 为申请人制备的 FITC 标记的抗体;曲线 3 为切割后的 FITC 标记的抗体(胃蛋白酶切割购自北京中衫金桥的 FITC 标记的抗体即得)。

[0022] 图 4 为不同抗体的荧光强度对比图。在图 4 中,横坐标为抗体,纵坐标为荧光强度;1 为切割后的 FITC 标记的抗体(胃蛋白酶切割购自北京中衫金桥的 FITC 标记的抗体即得);2 为申请人制备的 FITC 标记的抗体;3 为未切割的 FITC 标记的抗体,购自北京中衫金桥;图中的 a 是检测正常人血清的结果,b 是检测 AFP 浓度为 80ng/ml 的人血清的检测结果。

具体实施方式

[0023] 实施例 1

[0024] 1) 用 5%的戊二醛于 25℃对氨基微珠表面进行处理 1h;

[0025] 2) 利用醛基与氨基的希夫碱反应与蛋白 A 进行偶联,将蛋白 A 分子修饰到氨基微珠表面,偶联缓冲液为 PBS 溶液,偶联温度为 25℃,时间为 3h;

[0026] 3) 利用硼氢化钠将蛋白 A 与微珠形成的碳氮双键进行还原,处理条件为:将氨基微珠放入 6%的硼氢化钠水溶液中处理 1h;

[0027] 4) 利用蛋白 A 与抗体 Fc 端定向结合的特点,在磷酸缓冲液中将抗体与氨基微珠进行孵育过夜,孵育温度为 4℃,即得抗体固定化微珠;

[0028] 5) 运用 DMP(二甲基庚二酸亚胺脂——二盐酸化物)对抗体固定化微珠进行固定,处理方法为用 DMP 含量为 30M 的硼酸缓冲液对微珠进行处理 2 次,每次 45min,最后用含有乙醇胺的硼酸缓冲液终止反应;

[0029] 6) 将抗体固定化微珠与人类血清进行混合孵育,温度为 37℃,时间为 1h;

[0030] 7) 将抗体固定化微珠与兔抗人 AFP 混合孵育,孵育温度为 37℃,时间 1h;

[0031] 8) 将抗体固定化微珠与 FITC 标记的羊抗兔抗体混合孵育,孵育温度为 4℃,时间 2h;

[0032] 9) 用流式细胞仪对微珠荧光强度进行检测,从而检测血清样本中的 AFP(参见图 1)。

[0033] 该实施例主要是通过蛋白 A 活化的微珠对血清样品中的 AFP 进行检测,在图 1 中,纵坐标的值为流式细胞仪测出的荧光强度值,横坐标是人血清样品通过计算得到的 AFP 浓度。随着 AFP 浓度的降低,血清样品的荧光信号值下降,其拟合曲线函数为: $f(x) = 1312.13 + 2.089x$,相关系数 (R^2) 达到了 0.9967。在横坐标所示浓度范围内进行检测时,血清样品的荧光信号与浓度几乎呈线性关系。

[0034] 在流式细胞仪的检测过程中,每个样品检测 10000 个微珠的信号值,再计算平均值,结果具有统计学意义,图 1 中荧光强度值均为扣除背景荧光后的数值。

[0035] 实施例 2

[0036] 1) 取三组氨基微珠,用 5%的戊二醛于 25℃对氨基微珠表面进行处理 1h;

[0037] 2) 利用醛基与氨基的希夫碱反应与蛋白 A 进行偶联,将蛋白 A 分子修饰到氨基微珠表面,偶联缓冲液为 PBS 溶液,偶联温度为 25℃,时间为 3h;

[0038] 3) 利用硼氢化钠将蛋白 A 与微珠形成的碳氮双键进行还原,处理条件为:将氨基微珠放入 6%的硼氢化钠水溶液中处理 1h;

[0039] 4) 利用蛋白 A 与抗体 Fc 端定向结合的特点,在磷酸缓冲液中将抗体与氨基微珠进行孵育过夜,孵育温度为 4℃,即得抗体固定化微珠;

[0040] 5) 运用 DMP(二甲基庚二酸亚胺脂-二盐酸化物)对抗体固定化微珠进行固定,处理方法为用 DMP 含量为 30M 的硼酸缓冲液对微珠进行处理 2 次,每次 45min,最后用含有乙醇胺的硼酸缓冲液终止反应;

[0041] 6) 将抗体固定化微珠与人类血清进行混合孵育,温度为 37℃,时间为 1h;

[0042] 7) 将抗体固定化微珠与兔抗人 AFP 混合孵育,孵育温度为 37℃,时间 1h;

[0043] 8) 用 FITC 对切割的羊抗兔抗体进行标记;

[0044] 9) 将 3 组微珠分别用未切割的 FITC 标记羊抗兔抗体,切割后的 FITC 标记羊抗兔抗体,购买的 FITC 标记羊抗兔抗体孵育,孵育温度为 4℃,时间 2h;

[0045] 10) 用流式细胞仪对微珠进行荧光强度的检测,检测血清中的 AFP。

[0046] 该实施例主要是通过对荧光标记的抗体进行切割,去掉其 Fc 端,进一步降低背景,增大信噪比,切割后的背景较未切割降低了很多(参见图 2、图 3),并且可以检测出到更低浓度的样品,提高检测的可靠性(参见图 4)。

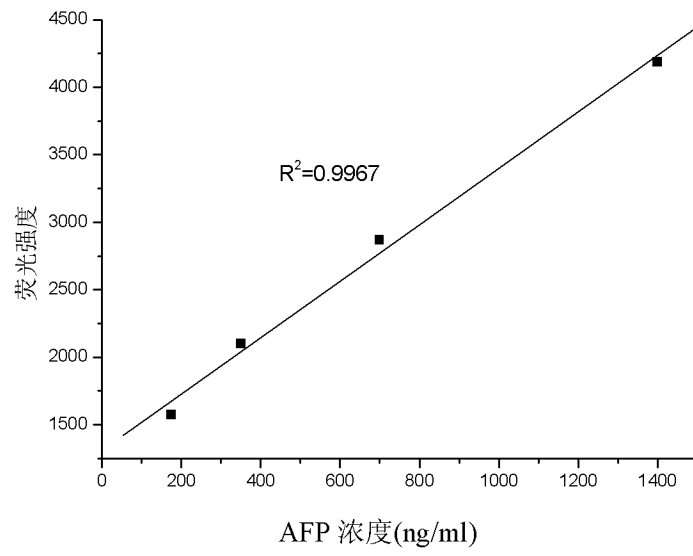


图 1

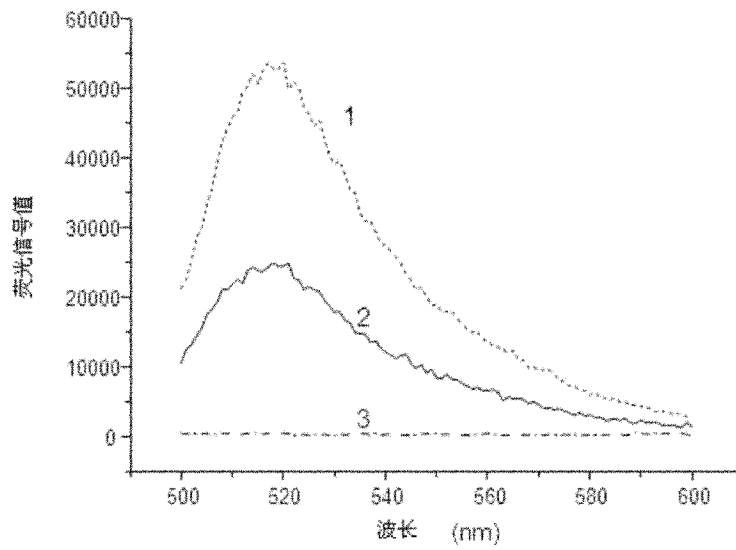


图 2

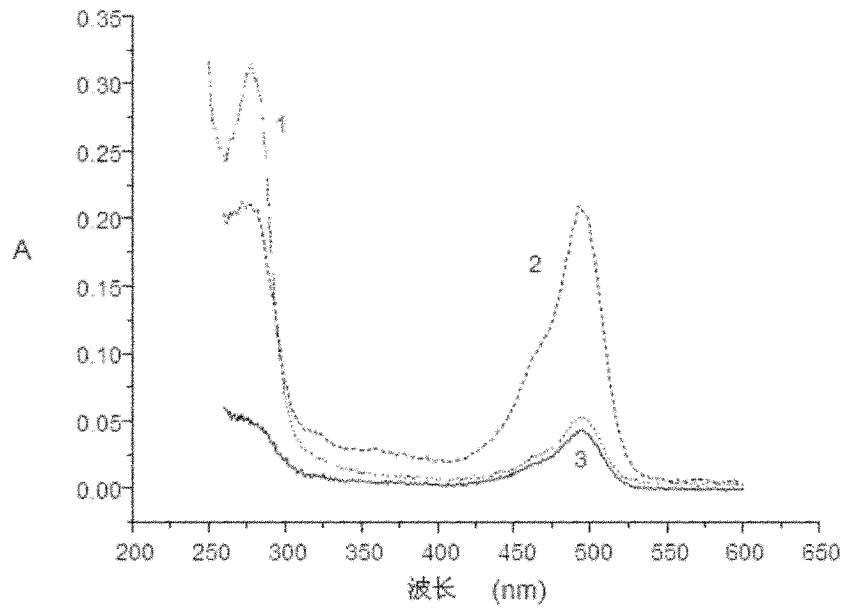


图 3

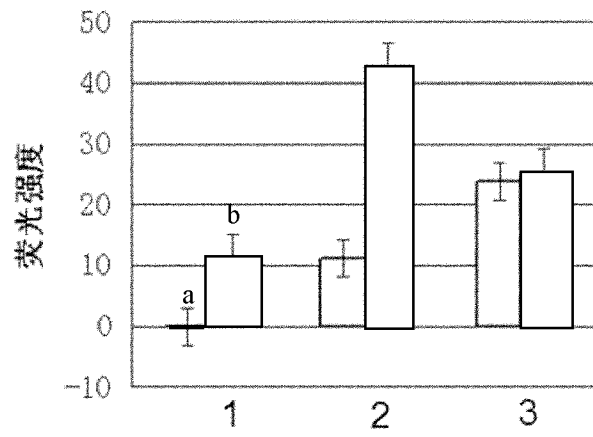


图 4

专利名称(译)	基于蛋白A固定化抗体的微珠免疫分析方法		
公开(公告)号	CN101936987A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010285031.8	申请日	2010-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	周雷激 赵征寰		
发明人	周雷激 赵征寰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01J1/00		
其他公开文献	CN101936987B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

基于蛋白A固定化抗体的微珠免疫分析方法。涉及免疫检测方法，提供一种能够实现氨基微珠上抗体分子定向偶联的基于蛋白A固定化抗体的微珠免疫分析方法。包括以下步骤：用桥联试剂对氨基微珠表面进行处理，将蛋白A偶联到氨基微珠上，再与AFP抗体1进行孵育，得抗体固定化微珠；将抗体固定化微珠与人血清样品进行孵育，结合了抗原AFP的抗体固定化微珠与AFP抗体2进行孵育，FITC标记的能够识别AFP抗体2的二抗与抗体固定化微珠进行孵育，检测荧光强度，即得人血清样品中的AFP。

Sjödahl