



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108333344 A

(43)申请公布日 2018.07.27

(21)申请号 201711437297.8

(22)申请日 2017.12.26

(71)申请人 南京迪格诺斯生物技术有限公司

地址 210000 江苏省南京市经济技术开发区
区科创路红枫科技园A6栋3楼

(72)发明人 金晶 王西龙 郭智慧

(74)专利代理机构 南京常青藤知识产权代理有限公司 32286

代理人 金迪

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

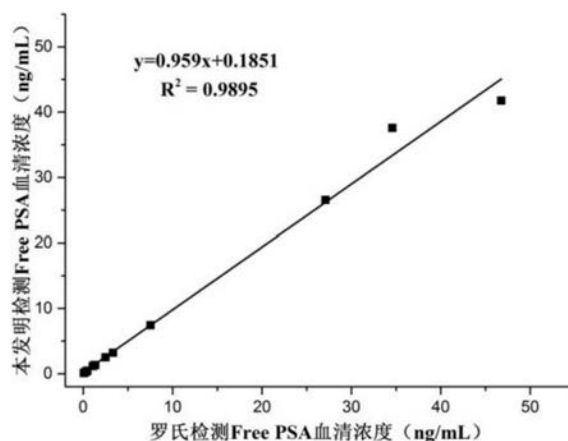
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用,具体涉及临床免疫分析技术领域,包括直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子以及发光物质标记的链霉亲和素,所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物结合且所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合或者为待测样本中的目标分析物类似物;或者所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合且捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。本发明基于链霉亲和素在结构特性,每摩尔的四聚体分子可结合四摩尔的生物素分子,并且两者之间具有极强的亲和力,构建一个循环放大的反应过程,实现了信号的放大而提高了灵敏度。



1. 一种高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在於,包括直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子以及发光物质标记的链霉亲和素,所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物结合且所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合或者为待测样本中的目标分析物类似物;或者所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合且所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。

2. 根据权利要求1所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在於,所述固相载体为超顺磁性微球;所述捕获分子包括蛋白质、多肽或生物活性小分子中的一种,其中蛋白质包括抗体或者抗原;所述标记分子包括蛋白质、多肽、多糖或者微球中的一种,其中蛋白质包括抗体或者抗原。

3. 根据权利要求2所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在於,所述发光物质为可以和激发液或者底物作用产生化学发光的物质,所述发光物质包括吖啶酯、吖啶磺酰胺、鲁米诺、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶。

4. 一种权利要求2或3所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在於,包括以下步骤:

1) 制备直接包被所述捕获分子的固相载体:将所述捕获分子包被在超顺磁性磁珠表面;

2) 将所述标记分子标记生物素;

3) 将链霉亲和素标记所述发光物质。

5. 根据权利要求4所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在於,步骤1)中的制备直接包被所述捕获分子的固相载体的方法如下:

S1、取磁珠原液,取反应缓冲溶液清洗磁珠,然后重悬于该缓冲溶液中;向其中加入一定浓度的EDC现配溶液,在37℃条件下活化0.5小时;活化完成后用磁珠清洗液清洗三次,然后重悬于反应缓冲溶液中;

S2、加入所述捕获分子,在37℃条件下反应3小时;反应完成后用磁珠清洗液清洗三次,最后重悬于磁珠储存液中。

6. 一种权利要求1-3任意一项所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的应用,其特征在於,包括在免疫分析方法中的应用,具体如下:

1) 将直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子、发光物质标记的链霉亲和素以及待测样品充分反应;

2) 经清洗液清洗分离出固相载体复合物或者磁性分离技术捕获上述复合物,然后用化学发光仪测定发光强度并计算分析物浓度。

7. 根据权利要求6所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的应用,其特征在於,在免疫分析方法中的夹心法中的应用,具体如下:

步骤1)中的混合物充分反应形成固相载体-捕获分子-目标分析物-(标记分子-链霉亲和素)_n复合物;其中,所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。

8. 根据权利要求6所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的应用,其特征在於,在免疫分析方法中的竞争法中的应用,具体如下:

步骤1)中的混合物充分反应形成固相载体-捕获分子-(标记分子-链霉亲和素)_n复合

物或目标分析物-(标记分子-链霉亲合素) n 复合物;其中,所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合标记分子。

9.根据权利要求6所述的高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的应用,其特征在于,在免疫分析方法中的竞争法中的应用,具体如下:

步骤1)中的混合物充分反应形成固相载体-捕获分子-(标记分子-链霉亲合素) n 复合物或固相载体-捕获分子-目标分析物;其中,所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合,所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。

高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于临床免疫分析技术领域,具体涉及高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析 (Chemiluminescence immunoassay, CLIA) 是将发光分析技术和免疫分析技术结合而建立起来的一种新的免疫分析技术,具有放射免疫的高灵敏度,以及酶联免疫的操作简便快速、易于标准化操作的优点。另有环保、试剂保质期长、稳定性高、便于实现自动化的特点,成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。尽管如此,随着化学发光免疫分析技术的普及以及临床上对于待检分子灵敏度需求的不断提高,迫切需要灵敏度更高的化学发光免疫分析技术。

[0003] 专利一种采用吖啶酯标记抗原或抗体分析方法(公开号CN 101609090A),公开了一种采用吖啶酯标记抗原或抗体分析方法以及用该方法制备一种免疫测定试剂盒,吖啶酯标记物在化学结构上有产生发光的特殊基团,在发光免疫分析过程中直接参与发光反应,通常这类物质没有本底发光,在反应中能用于检测低浓度或微量浓度的样品,是一类发光效率很高的发光剂,吖啶酯I、II分子和吖啶酰胺III,均可与抗体(或抗原)结合,生成具有化学发光活性强、免疫反应特异性高的标记抗体。但是检测灵敏度依然不够高。

[0004] 链霉亲和素是由链霉菌(*Streptomyces avidinii*)分泌的一种生物素结合蛋白质。在结构上,链霉亲和素以同源四聚体的形式存在,每摩尔的四聚体分子可结合四摩尔的生物素分子,两者之间具有极强的亲和力。该特性联合生物素偶联抗原/抗体检测技术,使其广泛应用于免疫学中检测信号的放大。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒,基于发光物质标记链霉亲和素循环放大的高灵敏度化学发光免疫分析法,能够提高灵敏度,解决现有化学发光免疫分析试剂盒灵敏度低的问题。

[0006] 本发明的另一目的是能够生产制备该高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒并能够使其在免疫分析方法中被应用。

[0007] 本发明提供了如下的技术方案:

[0008] 一种高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒,包括直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子以及发光物质标记的链霉亲和素,所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物结合且所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合或者为待测样本中的目标分析物类似物;或者所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合且所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。所述捕获分子是待测样本中的目标分析物类似物意味着所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合标记分子。

[0009] 优选的,所述固相载体为超顺磁性微球;所述捕获分子包括蛋白质、多肽或生物活性小分子中的一种,其中蛋白质包括抗体或者抗原;所述标记分子包括蛋白质、多肽、多糖或者微球中的一种,其中蛋白质包括抗体或者抗原。

[0010] 优选的,所述发光物质为可以和激发液或者底物作用产生化学发光的物质,所述发光物质包括吖啶酯、吖啶磺酰胺、鲁米诺、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶。

[0011] 一种高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 制备直接包被所述捕获分子的固相载体:将所述捕获分子包被在超顺磁性磁珠表面;

[0013] 2) 将所述标记分子标记生物素;

[0014] 3) 将链霉亲和素标记所述发光物质。

[0015] 优选的,步骤1)中的制备直接包被所述捕获分子的固相载体的方法如下:

[0016] S1、取磁珠原液,取反应缓冲溶液清洗磁珠,然后重悬于该缓冲溶液中;向其中加入一定浓度的EDC现配溶液,在37℃条件下活化0.5小时;活化完成后用磁珠清洗液清洗三次,然后重悬于反应缓冲溶液中;

[0017] S2、加入所述捕获分子,在37℃条件下反应3小时;反应完成后用磁珠清洗液清洗三次,最后重悬于磁珠储存液中。

[0018] 一种高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒的应用,包括在免疫分析方法中的应用,具体如下:

[0019] 1) 将直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子、发光物质标记的链霉亲和素以及待测样品充分反应;

[0020] 3) 经清洗液清洗分离出固相载体复合物或者磁性分离技术捕获上述复合物,然后用化学发光仪测定发光强度并计算分析物浓度。

[0021] 优选的,在免疫分析方法中的夹心法中的应用,具体如下:

[0022] 在免疫分析方法中的应用的步骤1)中的混合物充分反应形成固相载体-捕获分子-目标分析物-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物;其中,标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。也就是说包括如下步骤:

[0023] 1) 将直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子、发光物质标记的链霉亲和素以及待测样本混合,形成固相载体-捕获分子-目标分析物-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物;其中,标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合;

[0024] 2) 经清洗液清洗分离出固相载体复合物或磁性分离技术捕获上述复合物,然后用化学发光仪测定发光强度并计算分析物浓度。

[0025] 优选的,在免疫分析方法中的竞争法中的应用,具体如下:

[0026] 在免疫分析方法中的应用的步骤1)中的混合物充分反应形成固相载体-捕获分子-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物或目标分析物-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物;其中,标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,捕获分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合标记分子。也就是说包括如下步骤:

[0027] 1) 将直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子、发光物质标记的链霉亲和素以及待测样本混合,形成固相载体-捕获分子-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物或目标分析物-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物;其中,标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,捕获分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合标记分子;

[0028] 2) 经清洗液清洗分离出固相载体复合物或磁性分离技术捕获上述复合物,然后用化学发光仪测定发光强度并计算分析物浓度。

[0029] 优选的,在免疫分析方法中的竞争法中的应用,具体如下:

[0030] 在免疫分析方法中的应用的步骤1)中的混合物充分反应形成固相载体-捕获分子-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物或固相载体-捕获分子-目标分析物;其中,标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合,捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。也就是说包括如下步骤:

[0031] 1) 将包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子、发光物质标记的链霉亲和素以及待测样本混合,形成固相载体-捕获分子-(标记分子-链霉亲和素) n 复合物或固相载体-捕获分子-目标分析物;其中,标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合,捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合;

[0032] 2) 经清洗液清洗分离出固相载体复合物或磁性分离技术捕获上述复合物,然后用化学发光仪测定发光强度并计算分析物浓度。

[0033] 优选的,清洗分离出固相载体复合物可以使用PBS作为清洗液进行清洗。

[0034] 该发明是基于发光物质标记链霉亲和素循环放大的高灵敏度化学发光免疫分析,具有如下优点:

[0035] 1、利用链霉亲和素的四聚体结构,结合了更多的发光物质,放大了发光信号,有效地提高了分析的灵敏度。

[0036] 2、该化学发光免疫分析法试剂盒可以采用全自动分析检测,有利用加快分析时间。另有特异性强、重复性好、试剂稳定性高等特点。

附图说明

[0037] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0038] 图1是本发明检测Free PSA血清样本与罗氏试剂检测Free PSA血清样本相关性图;

[0039] 图2是本发明检测E2血清样本与贝克曼试剂检测E2血清样本相关性图。

具体实施方式

[0040] 针对本发明进行了夹心法和竞争法的实验检测。分别以游离前列腺特异性蛋白(Free PSA)项目做夹心法案例,以雌二醇(E2)项目做竞争法项目做竞争法案例。

[0041] 实施例1:夹心法对比实验(Free PSA)

[0042] 一、抗体直接包被的固相载体

[0043] 1. 取磁珠原液,取用50mM的MES缓冲溶液清洗磁珠两次,然后重悬于该缓冲溶液中。向其中加入一定浓度的EDC现配溶液,在37℃条件下活化0.5小时。活化完成后用MES缓

冲溶液清洗三次,然后重悬于反应缓冲溶液中。

[0044] 2.加入所用抗体,在37℃条件下反应3小时。反应完成后用MES缓冲溶液清洗三次,最后重悬于磁珠储存液中。

[0045] 二、分析步骤

[0046] 用PBS缓冲溶液配制浓度梯度:0.01、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0ng/mL的Free PSA标准品。在反应杯中,加入20μL一株Free PSA单克隆抗体包被的磁珠、20μL Free PSA标准品、50μL生物素标记的另一株Free PSA单克隆抗体、50μL吡啶酯衍生物标记的链霉亲和素。在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清洗液清洗液清洗分离出固相载体复合物,然后用化学发光仪测定不同浓度标准品发光强度,用log-log曲线拟合后计算回收率。

[0047] 三、传统双抗夹心法

[0048] 用PBS缓冲溶液配制浓度梯度:0.01、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0ng/mL的Free PSA标准品。在反应杯中,加入20μL链霉亲和素包被的磁珠、20μL Free PSA标准品、50μL生物素标记的一株Free PSA单克隆抗体、50μL吡啶酯衍生物标记的另一株Free PSA单克隆抗体。在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清洗液清洗液清洗分离出固相载体复合物,然后用化学发光仪测定不同浓度标准品发光强度,用log-log曲线拟合后计算回收率。

[0049] 以上体系所用的标准品浓度一致。将两种测试方法的测试结果列成表1。表1列在本实施例的最后。

[0050] 如表1所示,回收率在85%-115%的范围内,传统双抗夹心法检测范围的下限为0.4ng/mL。利用本发明增强后,检测范围下限达到0.01ng/mL,相比传统双抗夹心法,灵敏度提高了40倍。

[0051] 另外,如图1所示,使用本发明测定血清标本中Free PSA浓度和罗氏测定值的相关性对比,有良好的回收率及血清相关性,其中 R^2 可达到0.9895。实验证明基于发光物质标记链霉亲和素循环放大的高灵敏度化学发光免疫分析法提高了反应的灵敏度。

[0052] 表1:Free PSA项目中不同体系对标准品检测回收率的影响

[0053]

Free PSA 标准品浓度 (ng/mL)	不同体系对检测回收率的影响	
	传统双抗夹心法检测	本发明检测
0.01	-	115%
0.1	-	112%
0.2	125%	109%
0.4	113%	105%
1.0	106%	98%
2.0	103%	95%
4.0	101%	100%
10.0	105%	103%
20.0	103%	101%
30.0	98%	101%
40.0	100%	98%
50.0	101%	105%

[0054] 实施例2:竞争法及对比试验(E2)

[0055] 一、抗原直接包被的固相载体

[0056] 1.取磁珠原液,取反应缓冲溶液清洗磁珠,然后重悬于该缓冲溶液中。向其中加入一定浓度的EDC现配溶液,在37℃条件下活化0.5小时。活化完成后用磁珠清洗液清洗三次,然后重悬于反应缓冲溶液中。

[0057] 2.加入所用抗原,在37℃条件下反应3小时。反应完成后用磁珠清洗液清洗三次,最后重悬于磁珠储存液中。

[0058] 二、分析步骤

[0059] 用PBS缓冲溶液配制浓度梯度:10、20、40、80、160、320、640、1200、2500、3000、

4000、4800pg/mL的E2标准品。在反应杯中加入,30μL E2标准品、20μL E2置换剂、50μL生物素标记的E2单克隆抗体、50μL吡啶酯衍生物标记的链霉亲和素,在37℃条件下反应10min30s;反应结束后加入20μL E2-BSA包被的磁珠,在37℃条件下继续反应10min30s。用PBS清洗液清洗液清洗分离出固相载体复合物,然后用化学发光仪测定不同浓度标准品发光强度,用四参数曲线拟合后计算回收率。

[0060] 三、传统竞争法

[0061] 用PBS缓冲溶液配制浓度梯度:10、20、40、80、160、320、640、1200、2500、3000、4000、4800pg/mL的E2标准品。在反应杯中加入,30μL E2标准品、20μL E2置换剂、50μL吡啶酯衍生物标记的E2单克隆抗体,在37℃条件下反应10min30s;反应结束后加入20μL链霉亲和素包被的磁珠、50μL生物素标记的E2-BSA,在37℃条件下继续反应10min30s。用PBS清洗液清洗液清洗分离出固相载体复合物,然后用化学发光仪测定不同浓度标准品发光强度,用四参数曲线拟合后计算回收率。

[0062] 以上体系所用的标准品浓度一致。如表2所示(其中表2列在本实施例的最后),回收率在85%~115%的范围内,传统竞争法检测范围的下限为80pg/mL。利用本发明增强后,检测范围下限达到20pg/mL,相比传统竞争法,灵敏度提高了4倍。

[0063] 另外,如图2所示,使用本发明测定血清标本中E2浓度和贝克曼测定值的相关性对比,有良好的回收率及血清相关性,其中 R^2 可达到0.9897。实验证明基于发光物质标记链霉亲和素循环放大的高灵敏度化学发光免疫分析法提高了反应的灵敏度。

[0064] 表2:E2项目中不同体系对标准品检测回收率的影响

[0065]

E2 标准品浓度 (pg/mL)	不同体系对检测回收率的影响	
	传统竞争法检测	本发明检测
10	-	145%
20	139%	112%
40	125%	110%
80	100%	100%
160	92%	95%
320	90%	100%
640	89%	101%
1200	113%	107%
2500	92%	103%
3000	90%	95%
4000	103%	98%
4800	102%	104%

[0066] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

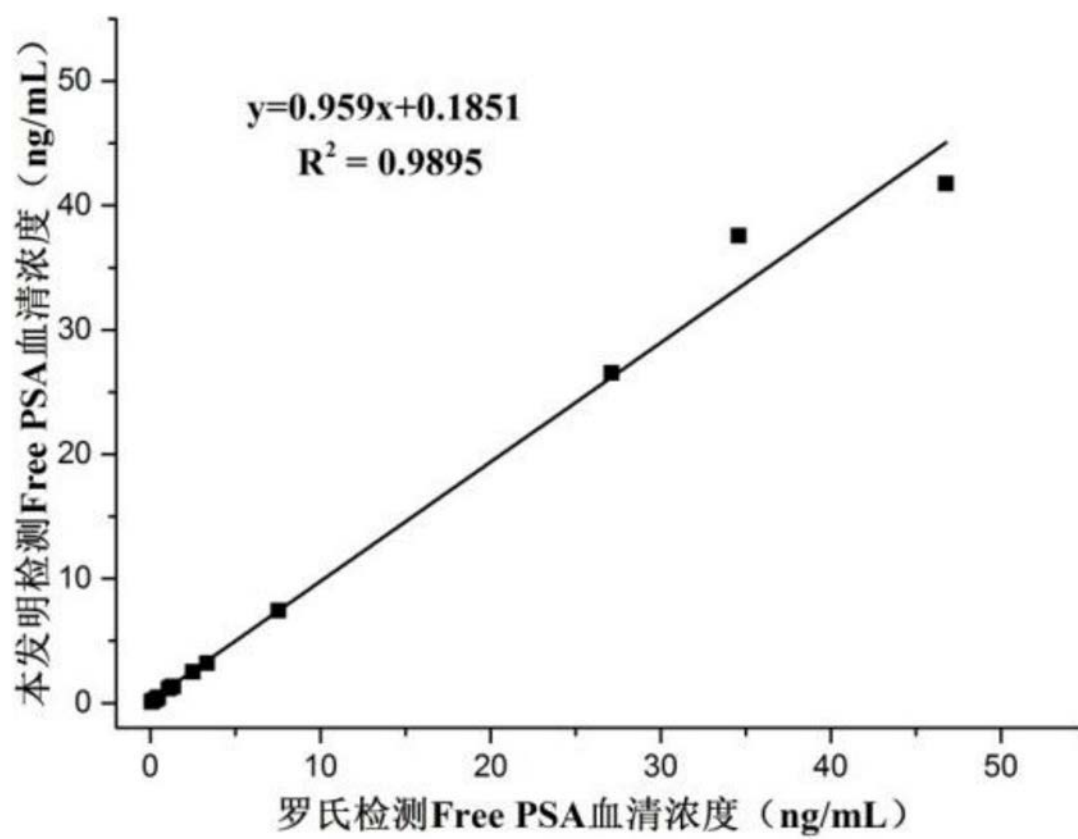


图1

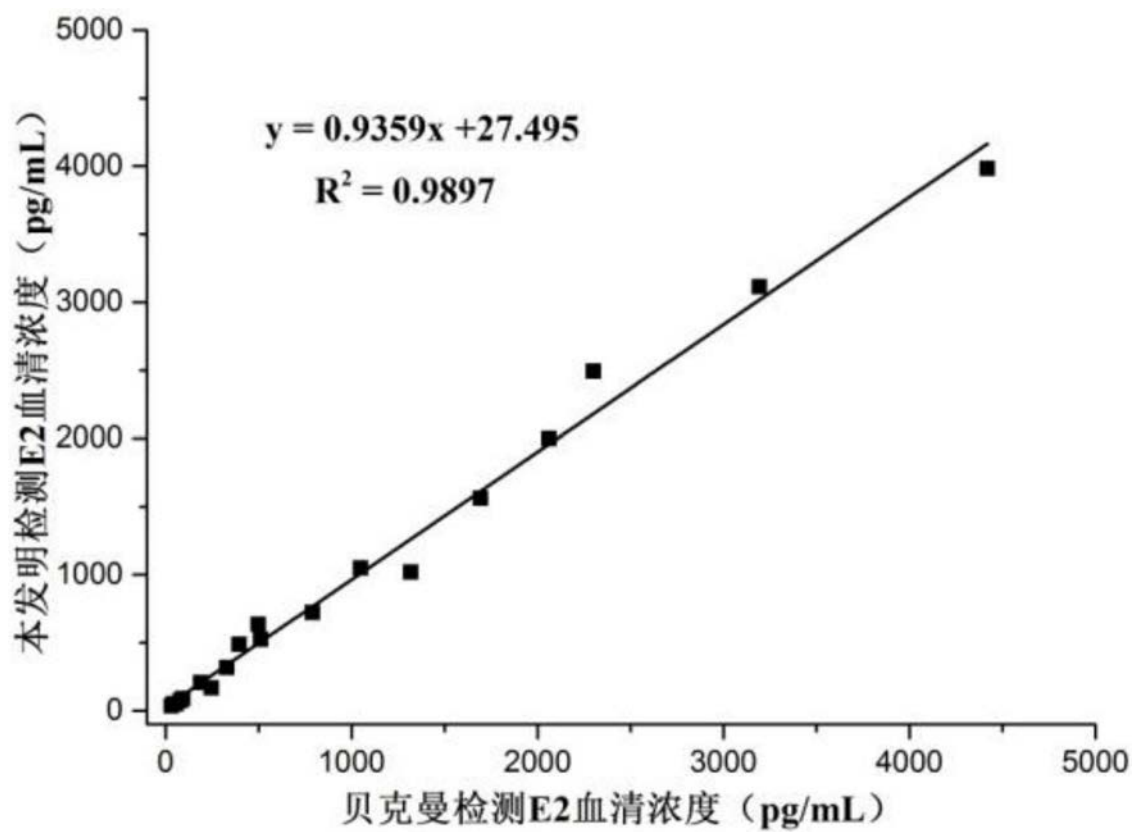


图2

专利名称(译)	高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108333344A	公开(公告)日	2018-07-27
申请号	CN2017111437297.8	申请日	2017-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	南京迪格诺斯生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京迪格诺斯生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京迪格诺斯生物技术有限公司		
[标]发明人	金晶 王西龙 郭智慧		
发明人	金晶 王西龙 郭智慧		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326		
代理人(译)	金迪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供高灵敏度的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用，具体涉及临床免疫分析技术领域，包括直接包被捕获分子的固相载体、生物素标记的标记分子以及发光物质标记的链霉亲和素，所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物结合且所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合或者为待测样本中的目标分析物类似物；或者所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物竞争性结合且捕获分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合。本发明基于链霉亲和素在结构特性，每摩尔的四聚体分子可结合四摩尔的生物素分子，并且两者之间具有极强的亲和力，构建一个循环放大的反应过程，实现了信号的放大而提高了灵敏度。

