



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802360 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810522179.5

(22)申请日 2018.05.28

(71)申请人 首都医科大学

地址 100000 北京市丰台区右安门外西头条10号

(72)发明人 黄沛力 熊亚敏

(74)专利代理机构 郑州先风专利代理有限公司
41127

代理人 王俊红

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

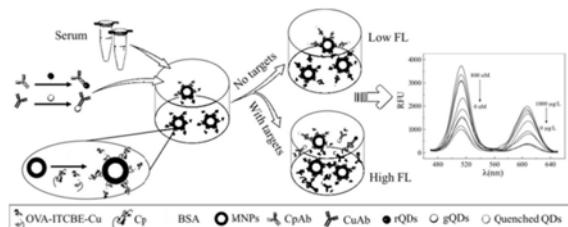
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒、制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及免疫化学分析技术领域,具体涉及一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒、制备方法及应用。该试剂盒包括铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体、量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗Cu-EDTA抗体。免疫载体具有荧光淬灭特性,免疫载体上的铜蓝蛋白和铜离子抗原与样品中的铜蓝蛋白和形成的EDTA-Cu竞争结合量子点标记的抗体;一定数量量子点标记的抗体与样品中的交换铜和铜蓝蛋白结合,使免疫载体捕获的量子点标记的抗体减少,量子点淬灭程度降低。量子点标记抗体荧光强度与样品中目标物浓度呈正相关,实现一步检测血清中的可交换铜和铜蓝蛋白。与传统夹心免疫荧光法相比,该试剂盒省去了目标捕获步骤,显著缩短检测时间。



1. 一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,其特征在于,包括铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体、量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗铜螯合物抗体;其中量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体的发光颜色不同;免疫载体对量子点具有荧光淬灭特性。

2. 如权利要求1所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,其特征在于,还包括铜离子标准溶液、铜蓝蛋白标准溶液、稀释缓冲液、免疫检测微孔板;其中稀释缓冲液中含有能够与铜离子形成与抗铜螯合物抗体相对应的铜螯合物的化合物。

3. 如权利要求1或2所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,其特征在于,所述铜离子抗原为铜离子螯合物人工抗原。

4. 如权利要求3所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,其特征在于,所述铜离子螯合物人工抗原为通过异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸为螯合剂将载体蛋白与铜离子偶联形成的铜离子螯合物人工抗原。

5. 如权利要求1或2所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,其特征在于,免疫载体为纳米磁珠;量子点标记的铜蓝蛋白抗体为红光量子点标记的铜蓝蛋白抗体;量子点标记的抗铜螯合物抗体为绿光量子点标记的抗铜螯合物抗体。

6. 如权利要求2所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,其特征在于,所述抗铜螯合物抗体为抗Cu-EDTA抗体;所述稀释缓冲液为含400nM EDTA和0.2M NaCl的0.01M PBS缓冲液,pH=7.2~7.4。

7. 一种如权利要求4所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒的制备方法,其特征在于,包括将铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体、量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗铜螯合物抗体、铜离子标准溶液、铜蓝蛋白标准溶液、稀释缓冲液、免疫检测微孔板,封装在一个试剂盒结构中,即完成。

8. 如权利要求7所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒的制备方法,其特征在于,包括制备铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体,具体制备方法包括以下操作步骤:

1) 制备铜离子抗原:取载体蛋白溶于HEPES缓冲液中,逐滴滴加螯合剂,室温振荡反应24h,得载体蛋白-螯合剂;将得到的载体蛋白-螯合剂溶于HEPES缓冲液中,逐滴滴加Cu²⁺溶液,反应过程中维持pH=8.0~9.0,室温孵育制得铜离子抗原;

2) 制备铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体:取载体,清洗后,重悬于硼酸盐缓冲液中,加入铜蓝蛋白,铜离子抗原和(NH₄)₂SO₄溶液,振荡反应,反应完成后去除未反应的铜蓝蛋白和铜离子抗原,并加入封闭缓冲液对未反应的载体活性位点进行封闭,即得铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体。

9. 如权利要求7所述的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒的制备方法,其特征在于,包括制备量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体,具体制备方法包括以下操作步骤:

(1) 取抗铜螯合物抗体,超滤清洗后,溶于PBS缓冲液中,加入生物素化试剂,室温涡旋反应,反应结束后,超滤清洗除去未反应的生物素,将所得产物重溶于PBS缓冲液中,即得生物素化的抗铜螯合物抗体;按照上述同样的方法制备获得生物素化的铜蓝蛋白抗体;

(2) 将步骤(1)制备的生物素化的抗铜螯合物抗体与链霉亲和素化的量子点混合,室温

涡旋反应后,进行超滤清洗去除未反应的量子点,将产物溶于硼酸盐缓冲液中,即得量子点标记的抗铜螯合物抗体;按照步骤(2)同样的方法制备获得量子点标记的铜蓝蛋白抗体。

10. 一种如权利要求2所述的试剂盒在检测血清中可交换铜和铜蓝蛋白方面的应用,其特征在于,其检测方法包括以下操作步骤:

A:取铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体,采用稀释缓冲液稀释后加入免疫检测微孔板中,分离弃上清,再在免疫检测微孔板中加入铜蓝蛋白标准溶液、稀释缓冲液稀释的铜离子标准溶液、量子点标记的抗铜螯合物抗体和量子点标记的铜蓝蛋白抗体,37℃静置反应后,检测体系荧光强度,绘制荧光强度与铜离子浓度标准曲线,以及荧光强度与铜蓝蛋白浓度标准曲线,得到荧光强度与铜离子浓度和铜蓝蛋白浓度的关系式;

B:按照上述步骤A同样的方法检测待测样品的荧光强度,带入步骤A得到的荧光强度与铜离子浓度和铜蓝蛋白浓度的关系式中,计算得到待测样品中可交换铜和铜蓝蛋白的浓度。

一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒、制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学分析技术领域,具体涉及一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒、制备方法及应用。

背景技术

[0002] 肝豆状核变性 (Wilson's disease, WD) 是一种铜 (Cu) 代谢失衡的常染色体隐性遗传病,其典型特征为铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, Cp) 合成障碍。该病好发于青少年,不及时的诊断和治疗将会导致不可逆的临床损伤及死亡。由于WD与多种Cu相关标志物有关,单一标志物检测不能充分排除或确认WD,因此,Cp和血清总Cu通常一起检测用来辅助诊断WD。人体Cp的合成由ATP7B调节,ATP7B基因的突变可导致Cp合成障碍,并造成非铜蓝蛋白结合Cu升高,也称为可交换Cu (exchangeable Cu, CuEXC),过量的CuEXC在血液中聚集,通过形成羟自由基对肝脏和神经系统造成损伤,并且可抑制WD患者体内的DNA修复酶。大量文献证明在WD诊断中CuEXC比血清总Cu具有更高灵敏度和特异性,可用于代替血清总Cu。目前临幊上,Cp通过免疫比浊法进行测定,而CuEXC通过血清总Cu与铜蓝蛋白结合Cu之间的差值进行粗略估计,但铜蓝蛋白结合Cu的过高估计使超过20%计算得到的CuEXC为阴性结果,因此该计算法得到的CuEXC量仍存在争议。然而,通过使用螯合剂将CuEXC从血清中分离后,可直接用传统仪器进行准确检测,例如电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES)、原子吸收光谱法 (AAS)、电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 等,然而,仪器检测所需仪器昂贵,样品前处理复杂,且需要高水平的技术人员。另外,采用不同方法对Cp和CuEXC进行单独检测所需时间长、工作量大,限制了其在临幊上的普及应用。因此,开发一种低成本、操作简单且结果可靠的血清中CuEXC和Cp同时检测方法对WD的临幊诊断具有重要的意义。

[0003] 多重免疫分析是一种高灵敏的疾病快速筛查方法,能够有效地降低分析时间和成本。化学发光、电化学发光、电化学和荧光等分析方法结合多重免疫分析都已被应用于肿瘤标志物的同时检测。其中,荧光免疫分析灵敏度高、线性范围宽、成本低、抗干扰能力强,已经成为多重免疫分析中一种重要的分析技术。荧光多重免疫分析的关键在于用不同发射波长的荧光染料对每个特定的目标物进行标记。量子点 (Quantum dots, QDs) 是具有独特光学特性的纳米晶,与传统有机染料相比具有宽且重叠的光谱、尺寸依赖的连续发射光谱、高量子产率和良好的光稳定性。这些优异的性能,特别是一元激发多元发射的性能,使量子点成为荧光多重免疫分析的理想信号标记,已被广泛应用于构建分子检测探针、细胞及组织成像。另外,纳米磁珠 (magnetic nanoparticles, MNPs) 是多重免疫分析中的另一个重要工具,通过将特定的识别分子 (通常是抗体或适配体) 固定在MNPs表面上,其可用于从复杂样品中捕获和分离目标物。这种识别和分离过程简单快速,无需任何离心和过滤。MNPs与QDs相结合构建的生物传感方法已被用于检测各种致病菌和疾病的生物标志物。这些方法的一般步骤是MNPs首先捕获并分离目标物,然后与生物功能化的QDs结合形成三明治夹心复合物。但夹心法具有两方面的缺点:即费时的目标物捕获过程和高成本的夹心形成过程(由于

夹心复合物的形成需要两种不同的识别分子)。

[0004] 鉴于上述问题,本发明基于抗原包被的MNPs和抗体功能化的QDs进行目标物识别和信号传导的原理实现了对血清中CuEXC和Cp的一步同时检测,既克服了传统的针对不同目标物采用不同方法检测导致的检测时间长,工作量大的缺陷,也克服了多重免疫分析过程中采用夹心原理检测导致的目标捕获过程的费时和成本高的缺陷。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺陷,本发明的目的之一是提供一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,对于血清中CuEXC和Cp的检测准确度高、可靠性好,且所需样品种体积小。

[0006] 同时,本发明的目的之二在于提供一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明的目的之三在于提供一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒的应用。

[0008] 为了实现以上目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,包括铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体、量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗铜螯合物抗体;其中量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体的发光颜色不同;免疫载体对量子点具有荧光淬灭特性。

[0010] 可选的,上述试剂盒还包括铜离子标准溶液、铜蓝蛋白标准溶液、稀释缓冲液、免疫检测微孔板;其中稀释缓冲液中含有能够与铜离子形成与抗铜螯合物抗体相对应的铜螯合物的化合物。

[0011] 可选的,所述铜离子抗原为铜离子螯合物人工抗原。

[0012] 进一步可选的,所述铜离子螯合物人工抗原为通过异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸为螯合剂将载体蛋白与铜离子偶联形成的铜离子螯合物人工抗原。可选的,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白。

[0013] 可选的,免疫载体为纳米磁珠;量子点标记的铜蓝蛋白抗体为红光量子点标记的铜蓝蛋白抗体;量子点标记的抗铜螯合物抗体为绿光量子点标记的抗铜螯合物抗体。

[0014] 可选的,所述抗铜螯合物抗体为抗Cu-EDTA抗体;所述稀释缓冲液为含400nM EDTA和0.2M NaCl的0.01M PBS缓冲液,pH=7.2~7.4。

[0015] 上述血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒的制备方法,包括将铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体、量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗铜螯合物抗体、铜离子标准溶液、铜蓝蛋白标准溶液、稀释缓冲液、免疫检测微孔板,封装在一个试剂盒结构中,即完成。

[0016] 上述试剂盒的制备方法,包括制备铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体,具体制备方法包括以下操作步骤:

[0017] 1)制备铜离子抗原:取载体蛋白溶于HEPES缓冲液中,逐滴滴加螯合剂,室温振荡反应24h,得载体蛋白-螯合剂;将得到的载体蛋白-螯合剂溶于HEPES缓冲液中,逐滴滴加Cu²⁺溶液,反应过程中维持pH=8.0~9.0,室温孵育制得铜离子抗原;

[0018] 2) 制备铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体:取载体,清洗后,重悬于硼酸盐缓冲液中,加入铜蓝蛋白,铜离子抗原和(NH₄)₂SO₄溶液,振荡反应,反应完成后去除未反应的铜蓝蛋白和铜离子抗原,并加入封闭缓冲液对未反应的载体活性位点进行封闭,即得铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体;

[0019] 可选的,上述试剂盒的制备方法包括制备量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体,具体制备方法包括以下操作步骤:

[0020] (1) 取抗铜螯合物抗体,超滤清洗后,溶于PBS缓冲液中,加入生物素化试剂,室温涡旋反应,反应结束后,超滤清洗除去未反应的生物素,将所得产物重溶于PBS缓冲液中,即得生物素化的抗铜螯合物抗体;按照上述同样的方法制备获得生物素化的铜蓝蛋白抗体;

[0021] (2) 将步骤(1)制备的生物素化的抗铜螯合物抗体与链霉亲和素化的量子点混合,室温涡旋反应后,进行超滤清洗去除未反应的量子点,将产物溶于硼酸盐缓冲液中,即得量子点标记的抗铜螯合物抗体;按照步骤(2)同样的方法制备获得量子点标记的铜蓝蛋白抗体。

[0022] 上述试剂盒在检测血清中可交换铜和铜蓝蛋白方面的应用,其检测方法包括以下操作步骤:

[0023] A:取铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体,采用稀释缓冲液稀释后加入免疫检测微孔板中,分离弃上清,再在免疫检测微孔板中加入铜蓝蛋白标准溶液、稀释缓冲液稀释的铜离子标准溶液、量子点标记的抗铜螯合物抗体和量子点标记的铜蓝蛋白抗体,37℃静置反应后,检测体系荧光强度,绘制荧光强度与铜离子浓度标准曲线,以及荧光强度与铜蓝蛋白浓度标准曲线,得到荧光强度与铜离子浓度和铜蓝蛋白浓度的关系式;

[0024] B:按照上述步骤A同样的方法检测待测样品的荧光强度,带入步骤A得到的荧光强度与铜离子浓度和铜蓝蛋白浓度的关系式中,计算得到待测样品中可交换铜和铜蓝蛋白的浓度。

[0025] 本发明试剂盒采用对量子点具有荧光淬灭特性的免疫载体,免疫载体的表面修饰铜蓝蛋白和铜离子抗原,同时采用发光颜色不同的量子点分别标记铜蓝蛋白和抗铜螯合物抗体。在对血清中的可交换铜和铜蓝蛋白检测时,免疫磁珠上的铜蓝蛋白和铜离子抗原与样品中的铜蓝蛋白和形成的铜螯合物竞争结合量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗铜螯合物抗体;在没有可交换铜和铜蓝蛋白存在时,量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体被铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫磁珠捕获,造成量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体两者荧光淬灭;当可交换铜和铜蓝蛋白存在时,一定数量的量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体与样品中的目标物结合,使铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫磁珠捕获的量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体减少,导致量子点标记的铜蓝蛋白抗体和量子点标记的抗铜螯合物抗体两者的荧光强度与样品中目标物浓度呈正相关,从而实现一步检测血清中的可交换铜和铜蓝蛋白。与传统夹心免疫荧光法相比,该试剂盒省去了目标捕获步骤,显著缩短检测时间;另外,该试剂盒对目标物检测时不需要昂贵的仪器,且操作简单;更重要的是,一次同时检测两种Cu相关标志物可以提高WD诊断的可靠性且降低诊断成本。

[0026] 本发明试剂盒的制备方法操作简便,易于控制,适于工业化推广应用。

附图说明

- [0027] 图1本发明实施例试剂盒一步同时检测血清中CuEXC和Cp方法原理图；
- [0028] 图2本发明实施例制备的人工抗原生物活性表征；a～f分别代表Cu²⁺的浓度：10, 20, 30, 40, 60, 100nM；
- [0029] 图3本发明实施例制备的Immuno-MNPs的Zeta电位表征；
- [0030] 图4本发明实施例制备的Immuno-MNPs生物活性表征；A～E代表Cu²⁺浓度：1, 5, 50, 200, 400nM；a～e代表Cp的浓度：0.5, 2, 8, 32, 128μg/L；
- [0031] 图5本发明实施例制备的Bio-CuAb生物活性表征；
- [0032] 图6本发明实施例制备的Bio-CpAb生物活性表征；
- [0033] 图7本发明实施例中不同浓度Cu²⁺及Cp对应的gQDs和rQDs荧光发射光谱图；
- [0034] 图8本发明实施例绘制的CuEXC检测标准曲线；
- [0035] 图9本发明实施例绘制的Cp检测标准曲线；
- [0036] 图10本发明实施例一步同时检测样品中CuEXC和Cp方法特异性；1～6分别代表不含Cu²⁺的金属离子混合液，缓冲液，含0.2μM Cu²⁺的金属离子混合液，蛋白质混合液，缓冲液，含0.2mg/L Cp的蛋白质混合液；
- [0037] 图11本发明实施例中不同方法对血清中CuEXC检测结果相关性分析；
- [0038] 图12本发明实施例中不同方法对血清中Cp检测结果相关性分析。

具体实施方式

- [0039] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。
- [0040] 下述实施例中使用到的仪器与试剂
- [0041] 铜蓝蛋白Cp、牛血清白蛋白(BSA)和EDTA • 2Na购自Sigma; Sulfo-NHS-LC-Biotin、Cp单克隆抗体(CpAb)、HRP标记的羊抗鼠IgG、人血清白蛋白(HSA)、转铁蛋白(TRF)和金属硫蛋白(MT)购买于Abcam；抗Cu-EDTA单克隆抗体(CuAb, 无锡立达生物科技有限公司)；异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸ITCBE(日本同仁化学)；HEPES、DMSO、卵清白蛋白(OVA)购自于上海阿拉丁生物科技有限公司；纳米磁珠(Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated, Invitrogen)；链霉亲和素化量子点QDs-515和QDs-605购买于武汉珈源量子点有限公司；超滤管(Millipore)；Cu²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Se²⁺, Cd²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺和Fe³⁺标准溶液(国家标准物质中心)，所用其他试剂均为分析纯，所有溶液均用Milli-Q超纯水(电阻率大于18.2MΩ • cm)配制。
- [0042] 使用的缓冲液如下：(1) buffer A: 含400nM EDTA和0.2M NaCl的0.01M PBS缓冲液, pH 7.2～7.4；(2) buffer B: 含0.1% BSA(w/v)的0.01M PBS缓冲液, pH 7.2～7.4；(3) PBST: 含0.5% (v/v) Tween-20的0.01M PBS缓冲液, pH 7.2～7.4；(4) BS: 0.1M, pH 9.5的硼酸盐缓冲液。
- [0043] 实施例
- [0044] 一、本实施例提供一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒，包括Cp和OVA-ITCBE-Cu修饰的免疫磁珠(Immuno-MNPs)、红光量子点标记的铜蓝蛋白抗体(rQDs-CpAb)、绿光量子点标记的抗Cu-EDTA抗体(gQDs-CuAb)、Cu²⁺标准溶液、Cp标准溶液、

稀释缓冲液(bufferA)、免疫检测微孔板。

[0045] 本实施例试剂盒同时检测血清中CuEXC和Cp方法原理,如图1所示:首先在MNPs表面同时修饰OVA-ITCBE-Cu和Cp形成immuno-MNPs,然后将链霉亲和素化量子点gQDs和rQDs分别于生物素标记的CuAb和CpAb结合形成量子点标记的抗体gQDs-CuAb和rQDs-CpAb;其次将immuno-MNPs、含有EDTA缓冲液稀释的目标物和量子点标记的抗体(QDs-Abs)混合,其中,immuno-MNPs上的抗原与样品中的自由Cp和形成的EDTA-Cu竞争结合QDs-Abs。在没有Cu²⁺和Cp存在时,QDs-Abs被immuno-MNPs捕获,造成gQDs和rQDs两者荧光强烈淬灭;当Cu²⁺和Cp存在时,一定数量的QDs-Abs与样品中的目标物结合,使immuno-MNPs捕获的QDs-Abs下降,导致gQDs和rQDs荧光淬灭程度下降。gQDs和rQDs两者的荧光强度与样品中目标物浓度呈正相关,可以据此构建同一样品中多种目标物的一步同时检测方法。与传统夹心免疫荧光法相比,本实施例试剂盒实现的一步法省去了目标捕获步骤,显著缩短检测时间;另外,检测过程中不需要昂贵的仪器,且操作简单;更重要的是,一次同时检测两种Cu相关标志物可以提高WD诊断的可靠性且降低诊断成本。

[0046] 二、制备本实施例提供的血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒,包括以下几个方面

[0047] 1.OVA-ITCBE-Cu人工抗原的合成与鉴定

[0048] OVA-ITCBE-Cu人工抗原的合成:选取OVA为载体蛋白,通过双功能螯合剂ITCBE与Cu²⁺结合,制备Cu²⁺的人工抗原,具体步骤如下:称取8mg OVA溶于3mL HEPES缓冲液(0.01M, pH 9.0)中,逐滴滴加100μL 10mg/mL的ITCBE,将混合物室温振荡反应24h;反应结束后,用10KD超滤管超滤除去未反应的ITCBE,得到OVA-ITCBE;将所得的OVA-ITCBE复溶于3mL 0.01M, pH 9.0的HEPES缓冲液中,逐滴滴加160μL 1mg/mL Cu²⁺溶液,将反应pH维持在8.0~9.0,室温孵育6h后超滤除去未反应的Cu²⁺,即得OVA-ITCBE-Cu人工抗原。

[0049] Cu²⁺作为金属离子,其自身不能作为抗原引起免疫反应,需利用双功能螯合剂与之结合形成可以被抗体识别的半抗原。本实施例以ITCBE为双功能螯合剂,OVA为载体蛋白,合成Cu²⁺人工抗原OVA-ITCBE-Cu,经ICP-AES检测,人工抗原合成过程中Cu含量变化见表1,在加入Cu²⁺之后,OVA-ITCBE-Cu中Cu含量较OVA-ITCBE明显增高,证明Cu²⁺人工抗原的成功合成。

[0050] 表1.人工抗原合成过程中Cu含量变化

[0051]	OVA	OVA-ITCBE	OVA-ITCBE-Cu
	C _{Cu} (μg/L)	0.884	0.991
			78.48

[0052] OVA-ITCBE-Cu人工抗原的生物活性鉴定:用OVA-ITCBE-Cu包被96孔板,4℃反应过夜;用PBST清洗3次,甩干,每孔加入100μL含0.5% BSA的PBS缓冲液在37℃下封闭90min;PBST清洗3次,甩干,将buffer A配制的不同浓度的Cu²⁺标准溶液与4000倍稀释的CuAb混合后加入孔中,每孔100μL,37℃反应90min;PBST清洗3次,甩干,每孔加入100μL 5000倍稀释的酶标二抗(HRP标记的羊抗鼠IgG),37℃反应60min;PBST清洗5次,甩干,加入TMB显色底物,37℃反应20min,加入2%H₂SO₄终止反应,测450nm处的吸光度。

[0053] OVA-ITCBE-Cu的生物活性通过上述ELISA进行鉴定,结果见图2,吸光度(OD)随Cu²⁺浓度的增加而降低,证明本实施例合成的OVA-ITCBE-Cu具有生物活性且可以被CuAb识别。

[0054] 2. 免疫磁珠的合成和生物活性的鉴定

[0055] 免疫磁珠的合成:取40 μ L MNPs,用BS清洗3次,重悬于246.8 μ L BS中;加入80 μ L 1mg/mL的Cp,40 μ L 2mg/mL的OVA-ITCBE-Cu和33.2 μ L 3M的(NH₄)₂SO₄,37℃振荡反应24h;反应结束后,磁分离,除去未结合的抗原,并加入400 μ L含0.5%BSA(w/v)的PBST,37℃振荡反应过夜,以封闭MNPs上未反应的活性位点;经磁分离清洗后,即得到Cp和OVA-ITCBE-Cu修饰的免疫磁珠(immuno-MNPs);将所得immuno-MNPs分散在400 μ L含0.1%BSA(w/v)的PBST中,4℃保存备用。

[0056] 用动态光散射对immuno-MNPs的Zeta电位进行表征,来验证immuno-MNPs表面是否修饰有Cp和OVA-ITCBE-Cu:immuno-MNPs合成后,应用动态光散射对OVA-ITCBE和Cp修饰前后的MNPs进行表征,观察MNPs表面电荷的变化,结果见图3。随着两种抗原在MNPs表面的修饰,MNPs电位绝对值增加,抗原修饰后的免疫磁珠带负电,主要是由于两种抗原在pH=7时带负电,初步表明两种抗原在MNPs表面的成功修饰。

[0057] 免疫磁珠的生物活性鉴定:将immuno-MNPs用PBS稀释一定倍数后加入96孔板中,每孔100 μ L,磁分离,弃上清;将buffer A配制的不同浓度的Cu²⁺标准溶液或Cp标准溶液与4000倍稀释的CuAb或CpAb混合后加入孔中,每孔100 μ L,37℃反应90min;磁分离且用PBST清洗3次,每孔加入100 μ L 5000倍稀释的酶标二抗(HRP标记的羊抗鼠IgG),37℃反应60min;磁分离,用PBST清洗5次,加入TMB显色底物,37℃反应20min,加入2%H₂SO₄终止反应,测450nm处的吸光度。结果如图4所示,随着Cu²⁺浓度和Cp浓度的增加,OD值减小,因此证明了在MNPs表面成功修饰了OVA-ITCBE及Cp,且二者均具有生物活性,在免疫反应中可以分别被CuAb及CpAb识别。

[0058] 3. 制备量子点标记抗体和抗体活性表征

[0059] 取出50 μ L CuAb(3mg/mL),加入150 μ L PBS,用10KD超滤管超滤清洗5次,最终溶于200 μ L PBS中;加入25 μ L新鲜配制的10mM sulfo-NHS-L-Biotin,室温涡旋反应30min;反应结束后,10KD超滤管超滤清洗5次,除去未反应的生物素,将所得产物溶于150 μ L PBS中,即得生物素化的CuAb(Bio-CuAb)。按上述步骤对CpAb进行生物素标记形成生物素化的CpAb(Bio-CpAb)。

[0060] 然后,将Bio-CuAb和Bio-CpAb分别于过量的链霉亲和素化的绿光量子点QDs-515(gQDs)和红光量子点QDs-605(rQDs)混合,室温涡旋反应30min,用100KD超滤管超滤除去未反应的量子点,将产物溶于0.05M pH 8.0的硼酸盐缓冲液中,分别得到量子点标记的抗体gQDs-CuAb和rQDs-CpAb。

[0061] 用ELISA对上述合成的Bio-CuAb和Bio-CpAb的生物活性进行鉴定,结果如图5和图6所示,随Cu²⁺浓度或Cp浓度的增加,OD值均降低,证明抗体上标记生物素后,其依然保持生物活性。

[0062] 三、采用本实施例试剂盒一步同时检测血清中游离铜及铜蓝蛋白的方法,包括以下操作步骤:

[0063] A:将immuno-MNPs采用buffer A稀释200~500倍,每孔100 μ L加入96孔板中,磁分离弃上清;加入buffer A稀释的Cu²⁺和Cp的标准溶液,同时加入一定倍数稀释的gQDs-CuAb和rQDs-CpAb,37℃反应60min,检测体系荧光强度(量子点荧光的激发波长为330nm,发射波长分别为515nm和610nm);按照上述方法分别检测加入不同浓度的Cu²⁺和Cp的标准溶液的体

系荧光强度,如图7所示,随着Cu²⁺及Cp浓度的增加,gQDs和rQDs的荧光强度(RFU)逐渐增加,对Cu²⁺和Cp的标准溶液浓度的对数(Log C_{Cu}或Log C_{Cp})和RFU的对数(Log RFU)进行线性回归分析得到该方法检测Cu²⁺和Cp的标准曲线,如图8及图9所示,得到Cu²⁺浓度与荧光强度的关系是为Log RFU=0.17775Log C_{Cu}+3.0760;Cp浓度与荧光强度的关系是为Log RFU=0.3496Log C_{Cp}+2.3116;

[0064] B:按照上述步骤A同样的方法加入待测样品,检测体系的荧光强度,将检测到的荧光强度值带入步骤A得到的荧光强度与Cu²⁺浓度、Cp浓度的关系式中,即得待测样品中可交换铜和Cp浓度。

[0065] 四、方法检测线性范围、检测限、方法特异性

[0066] 1、由图8及图9所示的标准曲线可计算得到对Cu²⁺检测的线性范围为1.0~800nM (R²=0.9418),对Cp的检测范围为10~1000μg/L (R²=0.9936)。

[0067] 2、方法检测限(LOD)通过极限稀释法测得,检测低浓度区Cu²⁺标准品和Cp标准品对应的RFU,并检测若干目标物空白样品得到 $\bar{X}+3SD$ 的值,以RFU> $\bar{X}+3SD$ 所对应的目标物浓度为方法检测限,因此,在选择的条件下,该方法对Cu²⁺和Cp的检测限分别为0.2nM和7.0μg/L。

[0068] 3、方法特异性

[0069] 该探针用于血清中CuEXC和Cp的检测可能受到血清中其它金属离子和蛋白质的干扰,因此选取8种常见金属离子Mn²⁺,Hg²⁺,Pb²⁺,Se²⁺,Cd²⁺,Ca²⁺,Mg²⁺和Fe³⁺和3种血清中含量较高的蛋白质HAS,TRF和MT对方法的特异性进行考察,结果如图10所示。8种金属离子混合溶液(每种金属离子的浓度为20μM)对应的荧光光谱和3种蛋白质混合溶液(每种蛋白质的浓度为50mg/L)对应的荧光光谱与缓冲液的光谱几乎重叠,当在金属离子混合液中加入0.2μM Cu²⁺和蛋白质混合液中加入0.2mg/L Cp时,gQDs和rQDs的RFU均显著增加。因此血清中常见金属离子及蛋白质对该方法检测CuEXC和Cp的影响可忽略,本实施例试剂盒能够特异性的检测血清中的可交换铜和铜蓝蛋白。

[0070] 4、方法的准确度和精密度

[0071] 对本实施例方法检测CuEXC和Cp的准确度和精密度进行考察,分别在稀释20倍的血清中(ICP-AES测定CuEXC的浓度为0.526μM)加入Cu²⁺标准溶液,使加入浓度为10,100和500nM;在稀释1000倍的血清中(ELISA测定Cp的浓度为37.4mg/L)加入Cp标准溶液,使加入的浓度为20,200和800μg/L。上述样品经本实施例方法检测6次得到该方法对血清检测的加标回收率。另外,上述样品分别在同一天内重复检测和在不同天重复检测,评价方法的精密度。结果如表2和表3所示。其中CuEXC检测日内和日间的加标回收率分别为85.2%~109.1%和86.2%~116.3%,对应的相对标准偏差(RSD)分别为6.6%~12.9%和8.4%~14.1% (n=6);Cp检测日内和日间的加标回收率分别为83.4%~106.1%和93.7%~106.7%,对应的RSD分别为5.5%~15.2%和6.4~16.9% (n=6)。表明该方法用于CuEXC和Cp检测的准确度和精密度均较高。

[0072] 表2方法检测血清中CuEXC的加标回收率及精密度(n=6)

[0073]	$C_{Cu^{2+}}$ (nmol/L))	Intra-day			Inter-day		
		$\bar{X} \pm SD$	Recovery (%)	RSD (%)	$\bar{X} \pm SD$	Recovery (%)	RSD (%)
	0	22.4±2.3	85.2	10.3	30.6±4.1	116.3	13.4
	10	39.6±3.8	109.1	9.6	31.3±4.4	86.2	14.1
	100	113.6±14.6	89.9	12.9	135.5±16.4	107.3	12.1
	500	559.9±37.2	106.4	6.6	512.2±42.9	97.3	8.4

[0074] 表3方法检测血清中Cp的加标回收率及精密度 (n=6)

[0075]	C_{Cp} (μ g/L)	Intra-day			Inter-day		
		$\bar{X} \pm SD$	Recovery (%)	RSD (%)	$\bar{X} \pm SD$	Recovery (%)	RSD (%)
	0	32.4±3.5	86.6	10.8	38.6±2.9	103.2	7.5
	20	47.9±7.3	83.4	15.2	53.8±9.1	93.7	16.9
	200	251.8±21.7	106.1	8.6	232.5±18.5	97.9	8.0
	800	791.6±43.3	94.5	5.5	893.2±57.2	106.7	6.4

[0076] 五、血清样本检测

[0077] 1、样本:12例初诊WD患者,24例经治疗的WD患者和64例健康人血清取自首都医科大学北京朝阳医院;

[0078] 2、检测方法和标准:该项检测经首都医科大学医学伦理委员会批准(2014YY47号),检测过程按照相关原则和规定执行。

[0079] 分别将血清样本采用本实施例方法一步检测CuEXC和Cp,血清用buffer A稀释10倍用ICP-AES检测CuEXC,血清用buffer A稀释1000倍用ELISA检测Cp;其中Cp的ELISA检测用商业化ELISA试剂盒进行;用ICP-AES检测血清CuEXC时,需要先用螯合剂将CuEXC从血清中分离,即在100 μ L血清中加入100 μ L 4mM EDTA溶液,室温涡旋反应60min,用10KD超滤管超滤,收集滤液用ICP-AES进行检测。

[0080] 3、对不同方法的检测结果进行分析:

[0081] 100例血清样本用本方法进行CuEXC和Cp的检测,同时分别用ICP-AES和ELISA试剂盒对血清中CuEXC和Cp进行检测,比较本研究所建立的方法与标准方法检测结果的差异。首先对不同方法检测结果之间的相关性进行分析,结果如图11和图12所示,本实施例方法对血清中CuEXC检测结果与ICP-AES检测结果的相关系数为0.8956 (n=100),对血清中Cp检测结果与ELISA试剂盒检测结果的相关系数为0.9801 (n=100),证明本实施例方法对血清中CuEXC和Cp的检测与标准方法检测结果相关性好。随后,用配对样本t检验对该方法检测结果与两种标准方法检测结果进行分析,结果发现CuEXC和Cp检测结果P值均大于0.01,与标准方法检测结果的差异无统计学意义。证明本实施例方法准确度高,能够有效用于血清中CuEXC和Cp的同时检测。

[0082] 4、本实施例方法对初诊WD患者、治疗后WD患者和健康人血清中CuEXC和Cp检测结果见表4。用独立样本t检验对不同3组人群的CuEXC和Cp含量进行统计分析发现,初诊WD患者的CuEXC和Cp与健康人有显著差异 (P<0.01),经治疗后,CuEXC显著降低 (P<0.01) 并达到正常水平 (P>0.01),而Cp与初诊患者无显著性差异 (P>0.01)。这些数据在一定程度上反映

了治疗过程中CuEXC和Cp的变化,过量的CuEXC经驱铜治疗排出体外,使血清中CuEXC下降至正常水平,而Cp含量仍然显著低于正常人群($P<0.01$),且与初诊患者相比无显著性变化($P>0.01$)。由于CuEXC在治疗过程中的可变性,因此,CuEXC不仅可以作为WD的诊断指标,且可作为诊断监测,而Cp仅可作为诊断指标。

[0083] 综上,本发明实施例利用MNPs的快速分离及荧光淬灭特性、单克隆抗体的高特异性以及QDs荧光标记检测的高灵敏度,建立了一种一步多重荧光免疫分析方法。该方法对CuEXC和Cp检测的LOD为0.2nM和7.0 μ g/L,可有效用于血清中CuEXC和Cp的同时检测,且不需要样品前处理过程,其检测结果与ICP-AES检测CuEXC和ELISA试剂盒检测Cp的结果无统计学差异。血清样本检测结果提示初诊WD患者血清中过量的CuEXC经治疗可下降至正常水平,而Cp无明显变化,表明除了作为WD诊断指标外,CuEXC还可作为治疗监测指标。另外,该检测方法在96孔板中进行,不需要昂贵的仪器且操作简单,在节省时间和成本方面具有重要意义,具有较大的临床应用潜力。

[0084] 另外,需要注意的上述实施例中免疫载体采用纳米磁珠,量子点分别采用红光量子点和绿光量子点是具体的举例说明,是要满足采用的免疫载体对量子点具有荧光淬灭特性,标记不同抗体的量子点发光颜色不同即可,不限于纳米磁珠、红光量子点和绿光量子点;上述实施例中抗铜螯合物抗体采用抗Cu-EDTA抗体只是对抗铜螯合物抗体的举例说明,其他市售的抗铜螯合物抗体均可应用在本发明试剂盒中,均在本发明试剂盒的保护范围内,只需要确保稀释缓冲液中含有能够与铜离子形成与抗铜螯合物抗体对应的铜螯合物化合物即可。

[0085] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解: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;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

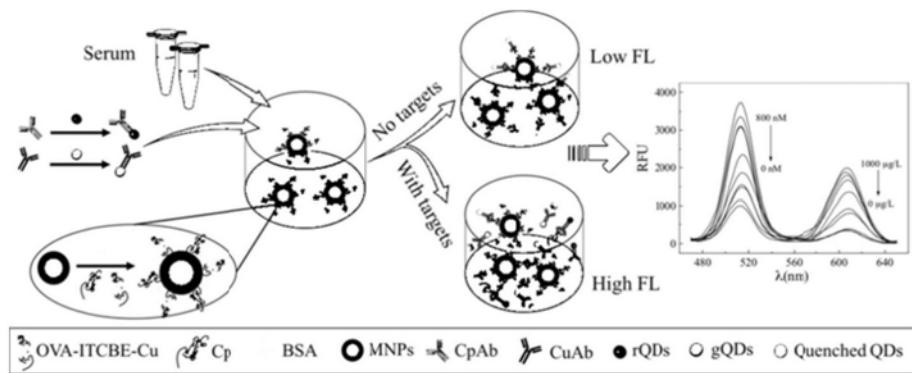


图1

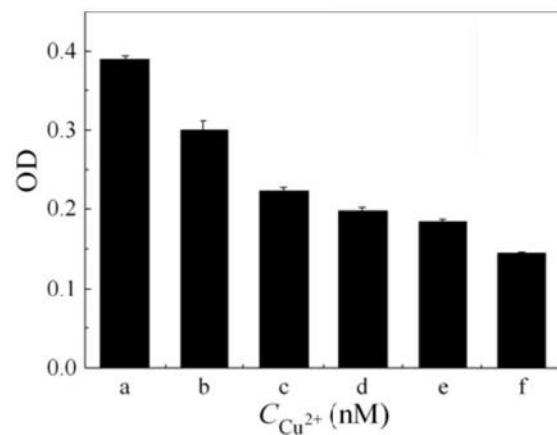


图2

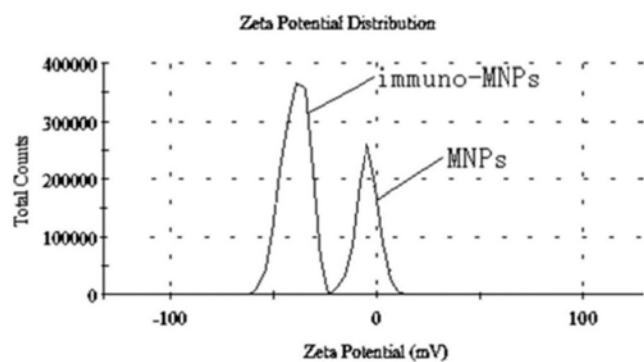


图3

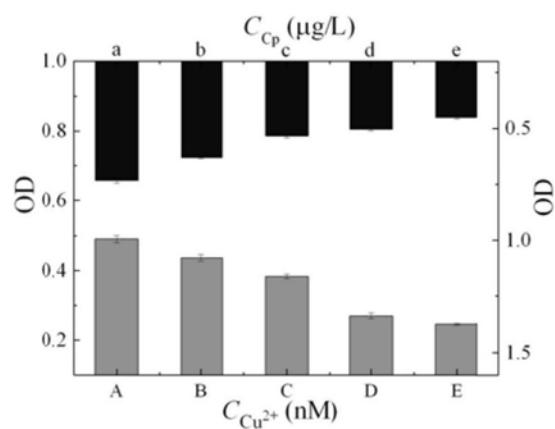


图4

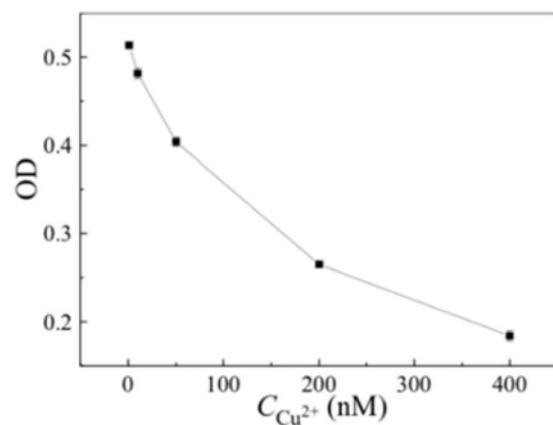


图5

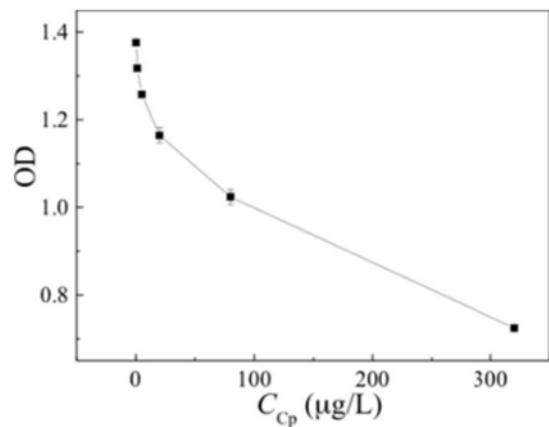


图6

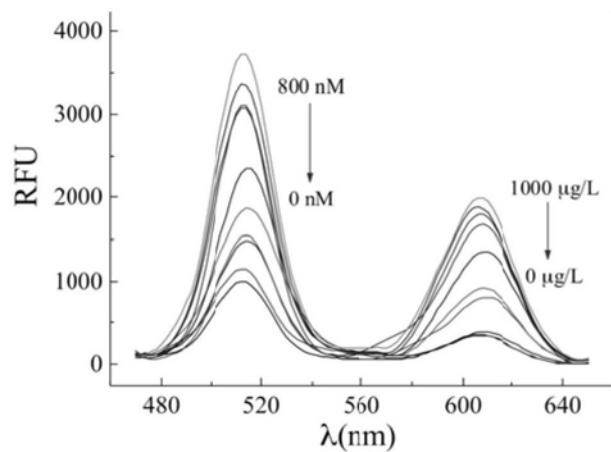


图7

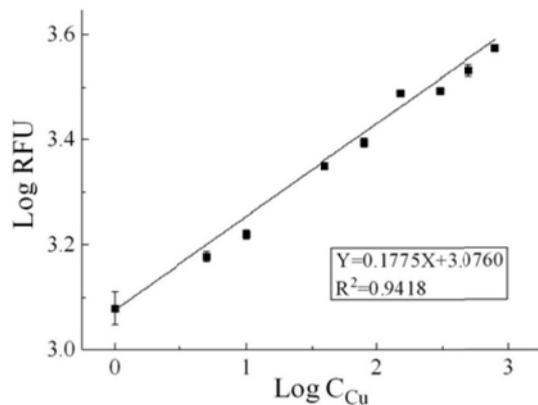


图8

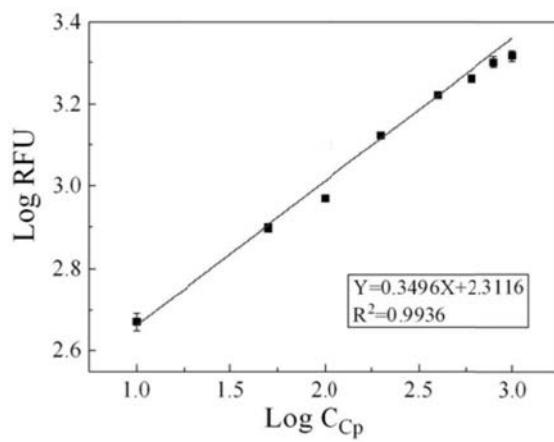


图9

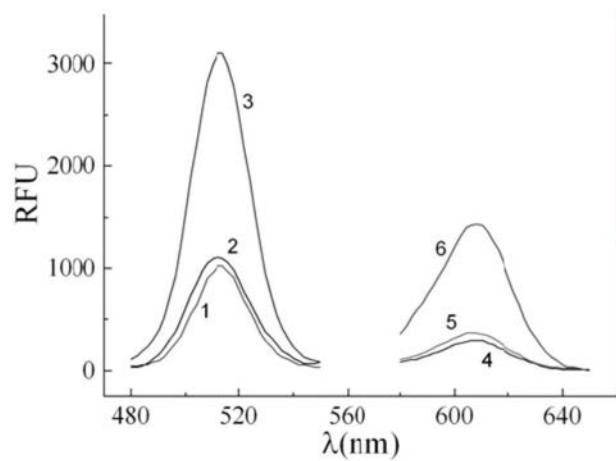


图10

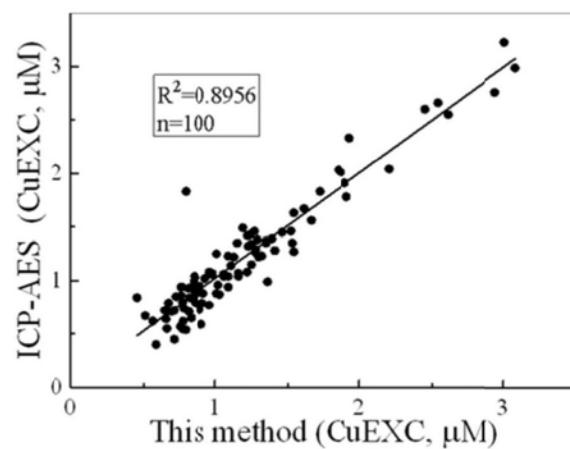


图11

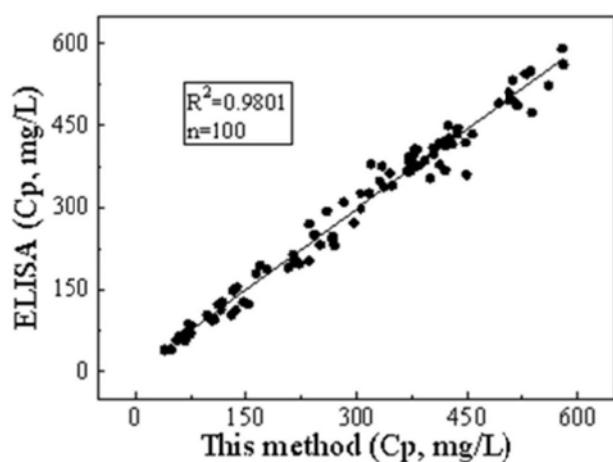


图12

专利名称(译)	一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒、制备方法及应用		
公开(公告)号	CN108802360A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810522179.5	申请日	2018-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
[标]发明人	黄沛力 熊亚敏		
发明人	黄沛力 熊亚敏		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/6428 G01N2021/6432 G01N2800/04		
代理人(译)	王俊红		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明涉及免疫化学分析技术领域，具体涉及一种血清中可交换铜和铜蓝蛋白一步同时检测用试剂盒、制备方法及应用。该试剂盒包括铜蓝蛋白和铜离子抗原修饰的免疫载体、量子点标记的铜蓝蛋白抗体、量子点标记的抗Cu-EDTA抗体。免疫载体具有荧光淬灭特性，免疫载体上的铜蓝蛋白和铜离子抗原与样品中的铜蓝蛋白和形成的EDTA-Cu竞争结合量子点标记的抗体；一定数量量子点标记的抗体与样品中的交换铜和铜蓝蛋白结合，使免疫载体捕获的量子点标记的抗体减少，量子点淬灭程度降低。量子点标记抗体荧光强度与样品中目标物浓度呈正相关，实现一步检测血清中的可交换铜和铜蓝蛋白。与传统夹心免疫荧光法相比，该试剂盒省去了目标捕获步骤，显著缩短检测时间。

