

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580009417.3

[43] 公开日 2009年4月29日

[11] 公开号 CN 101421619A

[22] 申请日 2005.3.25

[21] 申请号 200580009417.3

[30] 优先权

[32] 2004.3.25 [33] US [31] 60/556,065

[32] 2005.3.24 [33] US [31] 11/089,059

[86] 国际申请 PCT/US2005/009917 2005.3.25

[87] 国际公布 WO2005/094539 英 2005.10.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.25

[71] 申请人 邹松

地址 中国福建省福州市台江区太保境14号

共同申请人 邹冉

[72] 发明人 邹松 邹冉

[74] 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司

代理人 蔡学俊

权利要求书2页 说明书9页 附图4页

[54] 发明名称

通用快捷的免疫检测法及试剂和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一套新的免疫检测方法，试剂盒、试剂及其应用。本发明的特征在于：通过组合下述试剂中的至少两个非特异非竞争剂，特异性指示剂，一级抗体和抗原便可提供一易捷的免疫检测方法；该易捷的免疫检测法至少可以将下述步骤中的两个步骤：封闭、一级抗体结合、二级抗体结合，合并成一步反应。本发明的显著特征是将常规免疫检测中的步骤：封闭，一级抗体结合，二级抗体结合三个单独步骤合并成一步反应，并在一次反应中在固相上形成可检测的复合体，抗原-一级抗体-特异性指示剂或配体-受体-特异性指示剂。

1. 一个关于非特异性竞争剂在无预先封闭的免疫检测中的用法,其特征在於:该非特异性竞争剂是不被一级抗体和二级抗体或受体蛋白和配体所识别一类非特异蛋白。
2. 根据权利要求1所述的非特异性竞争剂在无预先封闭的用法,其特征在於:免疫检测中的使用浓度是1mg/ml-100mg/ml。
3. 一种特异性指示剂溶液,其特征在於:是含有预标记的能特异性地识别一级抗体(或受体)而不干涉一级抗体对抗原(或受体蛋白对配体)的结合能力的一类特异蛋白或抗体。
4. 根据权利要求3所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异蛋白或抗体其特征是能特异性识别一级抗体(或受体)的抗原结合区(或配体结合区)以外的任一个区域(不论是天然区域还是人造区域)。
5. 根据权利要求4所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异蛋白或抗体其特征是能特异性识别一级抗体(或受体蛋白)人为融合的Tag部分。
6. 根据权利要求4所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异蛋白或抗体其特征是能特异性识别免疫球蛋白(或Fc-融合蛋白)的Fc部分。
7. 根据权利要求3所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异蛋白或抗体是一类特异蛋白选自:蛋白L, 蛋白A, 蛋白G, 蛋白A/G, Fc-受体蛋白。
8. 根据权利要求3所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异性指示剂的标记其特征是一类可直接地或间接地被检测的蛋白或小分子,如:过氧化物氢酶、碱性磷酸酶、beta-半乳糖甘酶、beta-aminase、玫瑰红颜料、胶质金、biotine、生物素蛋白、luminase、荧光标志物、放射性同位素或这些标记物的混合。
9. 根据权利要求3所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异性指示剂溶液含有高浓度的盐。
10. 根据权利要求3所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的特异性指示剂溶液是在免疫检测中使用。
11. 根据权利要求7所述的一种特异性指示剂溶液,其特征在於:所述的Fc-受体蛋白其特征是在免疫检测中使用。
12. 一种组合,其特征在於:是至少包括下列a, b, c 中任意二个的组合: a. 一类不被使用在免疫检测系统中的一级抗体, 二级抗体或受体蛋白和配体所识别的非特异性竞争剂; b. 一类预标记的能特异性地识别一级抗体(或受体)而不干涉一级抗体对抗原(或受体对配体)的结合能力的特异性指示剂; c. 一级抗体(Primary antibody) 和/或抗原(Ag); d. 还可识别选择性地进一步包括辅助因子和/或蛋白酶抗化剂。
13. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的非特异性竞争剂是一类非特异性蛋白挑选自下列单一组分或其组合:清蛋白, 酪蛋白, 明胶, 卵白蛋白, 脱脂奶粉, 或者来自与产生被使用在免疫检测系统中的二级抗体之同类动物的未经免疫的 IgG 或血清。
14. 根据权利要求12所述所述的一种组合,其特征在於:所述的组合中非特异性竞争剂对使用在同一免疫检测中总抗体的重量比是1000-100000比1。
15. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的组合是含有高浓度盐的溶液。
16. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的组合包括一个非特异性竞争剂和特异性指示剂。
17. 根据权利要求16所述的一种组合,其特征在於:所述的组合还进一步包括一级抗体。
18. 根据权利要求17所述的一种组合,其特征在於:所述的组合还进一步包括抗原。
19. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的组合包括一个非特异竞争剂和一级抗体。
20. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的组合包括特异性指示剂和一级抗体。
21. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的组合包括一个非特异的竞争剂和抗原。
22. 根据权利要求12所述的一种组合,其特征在於:所述的组合其特征是在免疫检测中使用。

23. 一个通用快捷免疫检测法，其特征在于：所述的检测法是能够将下列免疫检测程序的 a, b, c 中任意两个步骤合并成一步反应：a. 封闭；b. 抗原结合；c. 一级抗体结合；d. 二级抗体结合。
24. 根据权利要求23所述的一个通用快捷免疫检测法，其特征在于：所述的通用快捷免疫检测法其特征是能够免疫检测程序中封闭和一级抗体结合的两个步骤合并成一步反应。
25. 根据权利要求23所述的一个通用快捷免疫检测法，其特征在于：所述的通用快捷免疫检测法其特征是能够免疫检测程序中封闭和二级抗体结合的两个步骤合并成一步反应。
26. 根据权利要求23所述的一个通用快捷免疫检测法，其特征在于：所述的通用快捷免疫检测法其特征是能够免疫检测程序中一级抗体结合和二级抗体结合的两个步骤合并成一步反应。
27. 根据权利要求23所述的一个通用快捷免疫检测法，其特征在于：所述的通用快捷免疫检测法其特征是能够免疫检测程序中封闭，一级抗体结合和二级抗体结合的三个步骤合并成一步反应。
28. 根据权利要求23所述的一个通用快捷免疫检测法，其特征在于：所述的通用快捷免疫检测法其特征是能够免疫检测程序中封闭，抗原结合，一级抗体结合和二级抗体结合的四个步骤合并成一步反应。
29. 一个通用快捷免疫检测法，其特征在于，所述的检测法含有：a. 一步快捷反应；b. 洗涤；c. 显色。
30. 根据权利要求29一个通用快捷免疫检测法，其特征在于，所述的检测法用于下列免疫检测分析：Immuno-blot, ELISA, Immunohistochemistry, Immunocytochemistry, 及受体蛋白和配体结合的检测。
31. 一种试剂盒含有可合并的组分，其特征在于：所述的含有可合并的组分是能够进行要求12所述的组合。
32. 一种快捷洗涤液，其特征在于：所述的快捷洗涤液是含有300mM-1M的高浓度盐。

通用快捷的免疫检测法及试剂和试剂盒

技术领域

本发明关于快捷检测蛋白的方法，试剂和试剂盒，适用于免疫检测领域。

背景技术

免疫检测或者免疫测定是一种检测特异蛋白(例如，抗原，抗体，受体蛋白，配体)的非常有力和灵敏的方法。两种非常典型的免疫检测法：酶联免疫吸收分析 (ELISA) 及免疫印迹法检测 (Western Blot) 开发于 1970 年代。随后由于辣根过氧化氢酶 (HRP)-共轭抗体和碱性磷酸酶 (AP)-共轭抗体的成功的开发，免疫检测法才被广泛地用于特异蛋白的定性和定量分析。

现行常规的免疫检测程序(例如免疫印迹法)包括 7 步：1. 封闭，2. 洗涤，3. 一级抗体结合，4. 洗涤，5. 二级抗体结合，6. 再洗涤，7. 发色(使用 colorimetric、autoradiographic 或者 chemiluminescent)。全部过程是费时、费力，通常要花费约 5 至 7 小时才能完成，因此开发一个相对简单快捷的免疫检测法是很有必要的。

现在已有不少关于改进该方面技术的报导。但这些改进大致可分为下述几类：1. 使用预埋并且预封闭的固相(例如，Osther 等，美国专利 4,885,235; Osther 等，美国专利 5,093,230; Urnovitz's 美国专利 5,447,837; Ralls 等，美国专利 6,015,681); 2. 使用预标记的一级抗体(例如，Pegg 等，美国专利 5,212,065; Ralls 等，美国专利 6,015,681; Ralls 等，美国专利 6,599,691; Stewart's, 美国专利 6,503,702; Slack 等，WO 03/052379; Cullum 等，WO 2005/003376); 3. 使用特别或者附加的设备(例如，Peg 等，美国专利 5,212,065; Slack 等，WO 03/052379; Tung 等，美国专利 6,627,459; Ralls 等，WO 97/05486)。然而，使用预标记的一级抗体的方法会降低检测灵敏度并减少选择一级抗体的灵活性，而且预标记一级抗体通常很昂贵且非常受来源限制，只有相当有限的预标记一级抗体在市场上可以买到。上述报导的所谓改进的免疫检测方法的最大界限是他们不通用的，仅仅适于检测一种或者一组特定蛋白(抗原或抗体)，有些方法仍然不可免除那些耗时的步骤：封闭，一级抗体结合，二级抗体结合。

本发明提供一种通用的快捷的免疫检测方法。该方法在免疫检测中至少合并以下步骤：封闭，抗原结合，一级抗体(Primary Antibody)结合，二级抗体(酶-共轭的探查抗体，Secondary Antibody)结合，中的任何两个步骤为一个快捷步骤。该本发明的最显著特征是将封闭，一级抗体结合及二级抗体结合这三个步骤合并成一步快捷反应。因此根据本发明开发的免疫检测的整个程序只要三个步骤：1) 一步快捷反应，2) 洗涤，及 3) 显色。整个过程花费不到一个小时。

发明内容

本发明涉及一种通用快捷的免疫检测法及试剂和试剂盒。其优点是：1 快捷，只要仅仅 0.5 - 1 小时(常规的免疫检测要 5~7 小时)。2 容易，只要一个步骤反应而不是一个多步骤程序。3 适合，适于自动的分析和手动分析。4 具有常规免疫检测方法相似的灵敏度。5 花费低，有效率，抗体和试剂，分析体制稳定并且可重复使用。6 简单，一步直接了断的过程，不需要标记一级抗体，不需要额外仪器和专门技能，也没有错综复杂的操作的过程。7 通用，适于绝大多数一级抗体，且适用于不同的种免疫检测，例如基于抗体-抗原反应的常规的免疫检测(Western Blot, ELISA 和 immunohistochemistry)，以及其它与抗体-抗原反应原理相似的分析(例如，基于受体蛋白-配体反应的检测方法)。本发明为 Western Blot, ELISA, IHC/ICC 及其它免疫检测提供了一项生产快捷免疫检测试剂盒的技术，也为现有的免疫检测试剂盒提供了改进的方法。

本发明涉及一种非特异性竞争剂的使用方法。非特异性竞争剂是一种不被使用在一个免疫检测系统中一级抗体或者二级抗体(或者受体蛋白或配体)所识别的非特异性蛋白或分子，

使用该方法，免疫检测中的封闭步骤可以被忽略也不需要预封闭的固相。

本发明涉及的非特异性竞争剂的用法是一种与在免疫检测系统中使用含有高浓度非特异性竞争剂的方法。

本发明涉及一种特异性指示剂溶液，它是含有预标记的特异性蛋白或抗体的溶液，该特异性蛋白或抗体能特异地识别一级抗体(或者受体蛋白)而不影响该一级抗体(或受体蛋白)对抗原(或配体)的识别能力。

本发明涉及的特异性指示剂溶液中特异蛋白或抗体的特征是能特异性识别一级抗体(或受体蛋白)的抗原结合区(或配体结合区)以外的一个区域(不论是天然区域还是人造区域)。

本发明涉及特异性指示剂溶液中的特异蛋白或抗体是能特异性识别一级抗体(或受体蛋白)的人为融合的部分，这个特异性指示剂溶液中的特异蛋白或抗体能特异性识别免疫球蛋白 Fc 部分(或 Fc-融合蛋白的 Fc 部分；该特异蛋白或抗体是一类蛋白选自：蛋白 L，蛋白 A，蛋白 G，蛋白 A/G，Fc-受体蛋白)。

本发明涉及特异性指示剂溶液中有关特异蛋白或抗体的标记。该标记是一种直接或者间接可被检测的蛋白或小分子，例如胶体金，过氧化氢酶，碱性磷酸(酯)酶， β galactosidase， β aminase, rhodamine, Biotine, avidin, luminase, 萤光标记物，放射性同位素及其混合物。

本发明在特异性指示剂的溶液中添加高浓度的盐。

本发明涉及在免疫检测中使用特异性指示剂溶液和 Fc 受体蛋白的方法。

本发明涉及一种组合，它含有至少如下组分中的两个：

- a. 非特异性竞争剂(一类不被检测系统内一级抗体或者二级抗体(或受体蛋白, 配体)所识别的非特异性蛋白)。
- b. 特异性指示剂(能特异地识别一级抗体(或者受体蛋白)而不影响该一级抗体(或受体蛋白)对抗原(或配体)的识别能力的一类预标记的特异性蛋白或抗体)。
- c. 一级抗体(1st Ab.)。
- d. 一种抗原(Ag)。

还可以选择性地包括 Cofactor 或者蛋白酶抑制剂。

本发明所涉及的非特异性竞争剂是一非特异性蛋白选自：来自与二级抗体相同动物种的正常 Igs (immunoglobins)或血清、清蛋白、酪朊、明胶、蛋清白蛋白、脱脂奶粉及其混合物。

本发明涉及在非特异性竞争剂与抗体的组合中所使用的非特异性竞争剂的重量比率比抗体高。

本发明涉及的组合溶液中含有高浓度的盐。

本发明涉及在含有非特异性竞争剂和特异性指示剂的组合中再加入一级抗体和更进一步加入抗原。

本发明涉及含有非特异性竞争剂和一级抗体的组合；含有特异性指示剂和一级抗体的组合；非特异性竞争剂和抗原的组合。

在免疫检测中使用的根据本发明所述的那些组合方法也作为本发明的一部分。本发明也是关于一种通用的快捷免疫检测方法，该方法在免疫检测的一个反应中至少合并以下步骤中的任何两个：

- a. 封闭。
- b. 抗原结合。
- c. 一级抗体结合。
- d. 二级抗体结合。

本发明涉及在免疫检测中合并封闭和一级抗体结合成为一步反应的通用快捷免疫检测方法；在免疫检测中合并封闭和二级抗体结合成为一步反应的通用快捷免疫检测方法；在免疫检测中合并一级抗体结合和二级抗体结合成为一步反应的通用快捷免疫检测方法。

本发明涉及在免疫检测中合并封闭,一级抗体结合和二级抗体结合成为一步反应的通用快捷免疫检测方法;在免疫检测中合并封闭,抗原结合,一级抗体结合和二级抗体结合成为一步反应的通用快捷免疫检测方法。

本发明的通用快捷免疫检测法的基本步骤包括:一步快捷反应;洗涤;显色。

本发明所述的通用快捷免疫检测方法适合的免疫检测有:ELISA, Immunohistochemistry, immunocytochemistry 及受体蛋白-配体结合的检测法。

本发明涉及一种试剂盒,它含有可以组装成本发明所述的那些组合体之组分。本发明也涉及一种包含高浓度盐的快捷洗涤液。

本发明的其它特征将通过以下详细的描写进一步阐明。然而,本发明的具体实施将通过具体实例并插图作详细说明,因为在本发明的概念和范围内的各种变化和修饰会更有助于业内人对本发明的理解。实例之一:对于受体蛋白-配体检测法,所用的方法,试剂盒及试剂的用法,业内人完成可以参考抗原-抗体检测法的实例在本发明的概念和范围内进行修饰。因此依照本发明原理所进行的受体-配体速测这也算是与本发明等值的一部分,尽管这没有被特异性和特异地描述或请求权利。

附图说明

图 1, 点迹法检测结果扫描图。在一步快捷点迹检测中考察不同的非特异性竞争剂的封闭能力。在使用山羊抗兔子 IgG 的抗体测试兔子 IgG 的点迹(法)实例中考察六种非特异性竞争剂:BSA, 脱脂奶粉, 鸡蛋白蛋白, 山羊 IgG, 山羊血清和明胶。其结果表明:没有使用非特异性竞争剂(负对照组 A), 由于过高的非特异性结合点迹非常黑几乎不可被检测;比较起来,通过使用非特异性竞争剂(C-J), 抗体非特异性结合背景戏剧性被降低到一相似于预封闭组(B)的水平。这结果显示使用非特异性竞争剂可以合并封闭与抗体结合为一步反应并取得相似于通过常规检测程序才能取得的结果。

图 2, 用点迹法考察在免疫检测中将一级抗体结合和二级抗体结合合并为一步反应的可能性。在这实验中,抗原被点滴到 NC 膜上经预封闭后分别用两种不同的方法:一步反应法(合并一级抗体结合和二级抗体结合为一步反应)和常规免疫检测法(先进行一级抗体结合,经洗涤后再进行二级抗体结合)进行检测。这实验结果证明:通过使用特异性指示剂(Fc-特异的二级抗体)一步反应法(面板 1)可以取得与使用常规的程序相同的检测效果(面板 2)。

图 3, 是一张显示使用不同种二级抗体进行快捷 ELISA 所得的结果比较图。在这实验中,用两种不同的二级抗体:山羊抗鼠全部 IgG-HRP (这是一常规 ELISA 中常用的二级抗体)山羊抗鼠 IgG Fc-HRP, 进行快捷的 ELISA 以检测预包埋的抗原(galactosidase)。分析结果表明只有使用 Fc-特异性二级抗体能得到强的信号(方形曲线), 而使用通常的二级抗体仅能得到一个很弱的信号(三角形曲线), 而单独使用 Fc-特异性二级抗体没有信号被检测到(菱形曲线)。这结果提示:1 通常的二级抗体会干扰一级抗体结合抗原的能力, 因此通常的二级抗体(例如抗全部的 IgG)不适合于通用快捷的免疫检测, 即使它适于常规的 ELISA。2 一个 Fc-特异性二级抗体不会干扰一级抗体结合抗原的能力特异性结合成一特异地与一级抗体结合, 并且不会非特异地与抗原或其它蛋白结合, 因此 Fc-特异性二级抗体可以作为特异性指示剂用于合并一级抗体结合和二级抗体合的一步反应。在图中, 曲线上每一个注明的带有标准偏差的点代表两次个别的 OD450 分析平均值。

图 4, 是一扫描图显示通用快捷免疫印迹法和常规的免疫印迹法具有相似的检测灵敏度。用本发明的快捷方法和用常规的方法在免疫印迹法检测 GST 蛋白的实例中显示相似的灵敏度, 但是测试时间和程序是大不相同的, 快捷方法只要 30 分钟 3 步骤而通常方法要 5 个小时和 7 个步骤。

图 5, 是一张比较图, 显示用通用快捷免疫检测法和常规免疫检测法在间接 ELISA 检测 GST 蛋白的结果。两种方法具有可比较的灵敏度, 但是使用通用快捷方法测试时间比用常规检测法短得多(30 分钟比 5 小时)并且分析程序也简单得多的(3 步骤比 7 步骤)。在图中, 曲线上每一个注明的带有标准偏差的点代表两次个别的 OD450 分析平均值。

图 6, 是一张显示用通用快捷免疫检测法进行俘获 ELISA (三明治 ELISA) 所得到的一条标准曲线图。该实验证明通用快捷免疫检测法不仅适于间接 ELISA 也适于更加错综复杂的捕获 ELISA。在这通用快捷的捕获 ELISA 中, 封闭, 抗原结合, 一级抗体结合, 二级抗体结合可以合并成一步快捷的反应而不需要使用预标记的一级抗体。在图中, 曲线上每一个注明的带有标准偏差的点代表两次个别的 OD450 分析平均值。

图 7, 是一张标准曲线图显示用通用快捷免疫检测法检查 TNF-受体蛋白结合配体能力的结果。该实验用通用快捷免疫检测法检查了 TNF-受体蛋白在一系列浓度下结合配体的能力。其结果证明通用快捷免疫检测法适于检测受体蛋白的配体结合能力。这种快捷的方法成功地将封闭, 结合的受体蛋白与配体, 检测抗体与受体蛋白结合合并成一步反应。这个实验也是一个在一步快捷的反应系统中使用含有人工融合的区域受体蛋白的实例 (本例中, TNF-受体蛋白的人工融合区域是人 IgG 的 Fc 部分)。在图中, 曲线上每一个注明的带有标准偏差的点代表两次个别的 OD450 分析平均值。

图 8, 是一扫描显微照片显示使用通用快捷免疫染色法和常规免疫染色法进行免疫细胞化学 (immunocytochemistry-ICC) 检测 Flag-tagged 蛋白在 CHO 细胞中表达情况所得结果。比较结果显示两种方法具有相似的灵敏度, 但是测试时间和程序是大不相同的: 30 分钟和 3 步 (通用快捷法) 比 5 小时和 7 步 (常规的方法)。如图所示, A 代表常规免疫检测法, B 代表快捷免疫检测法, C 代表没有免疫染色的对照组。图上箭头所指之处代表由抗体探测到的在细胞中表达的特异蛋白。

具体实施方式

实施例 1

使用不同类型二级抗体作快捷 ELISA

材料:

- 包埋缓冲液: 50mM 碳酸盐碳酸氢盐缓冲液 pH=9。
- 一步快捷反应液: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH=8, 30mM EDTA 钠盐, 0.5M NaCl, 0.5% Azide 钠, 50ug/ml Ampicillin, 5mg/ml MgCl₂, 5% 鱼明胶, 1ug/ml 热休克蛋白-70, 50ug/ml HRP-山羊抗兔子 IgG-Fc 抗体和 50ug/ml HRP-山羊抗鼠 IgG-Fc 抗体。
- 非特异性竞争剂溶液: 30mM EDTA 钠盐, 0.5M NaCl, 5mg/ml MgCl₂, 0.05% 钠 Azide 和 10mg/ml BSA, 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH=8。
- 快捷洗涤液: 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH=8, 0.5M NaCl, 0.2% Tween20。
- 抗原: β -galactosidase。
- 一级抗体: 抗 β -galactosidase 鼠 IgG。
- 二级抗体: HRP-山羊抗鼠 IgG (H+L) 抗体。
- 底物: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 液体 (SIGMA 公司, T8665)。
- 固相: 96-孔 Microtiter ELISA 盘子。
- 终止液: 0.5M H₂SO₄, 或 1N HCl。

样品处理:

- 包埋: 用包埋缓冲液系列稀释抗原 (β -galactosidase) 成八个的不同浓度从 500ng 开始 3X 稀释至 0.7 和 0.00ng/ml。将此稀释液添加到 96-孔的 ELISA 盘中 (每槽 100ul) 并孵育二个小时, 然后除去包埋溶液并用快捷洗涤液 (每次每槽 150ul) 洗涤三次。
- 抗体反应溶液: 准备三组抗体反应溶液如下: A. 5 ml 一步快捷反应溶液加 5ug 一级抗体 (抗 β -galactosidase 鼠 IgG); B. 5 ml 一步的快捷反应液 (不加一级抗体); C. 5ml 非特异性竞争剂溶液加 5ug 一级抗体 (抗 β -galactosidase 鼠 IgG) 和 5ug 二级抗体 (HRP-山羊抗鼠 IgG (H+L) 抗体)。

免疫检测 (快捷间接 ELISA):

1. 在没有预封闭的包埋了抗原的系列孔槽中, 分别增加 100ul/每槽上述准备的抗体反应溶液 A, B 和 C, 然后在室温孵育 30 分钟。

2. 移去所有抗体反应溶液并用快捷洗涤液(200ml/槽)洗涤孔槽三次。
3. 在每个槽里加 100ul TMB 底物并孵育 1-5 分钟, 至理想颜色显出后再加 100ul 的终止液(0.5M H₂SO₄), 然后用 microtiter 读盘仪在 450nm 测定 OD。

结果:

在图 3 内, 显示工作的 Fc 特异二级抗体穿快捷间接 ELISA 最槽, 弱的信号被在使用正常的二级抗体的分析过程中查明并且不是信号被查明单独使用 Fc 特异的二级抗体没有一级抗体。这建议那: 1) 一正常 2 抗体干涉结合性能的一级抗体, 因此, 不有益于快捷的免疫检测, 即使它有益于常规的 ELISA 和 2) 一 Fc 的特异 2 抗体——一级抗体的依靠指示剂, 非具体抗原特异性或者其它蛋白结合, 因此, 它是快捷的免疫检测的槽抗体特异性指示剂。

实例 2

快捷免疫印迹检测与常规的免疫印迹检测的比较

材料:

- 一步快捷反应液: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH=8, 30mM EDTA 钠盐, 0.5M NaCl, 0.05% 叠氮化钠, 50ug/ML Ampicillin, 5mg/ML MgCl₂, 5% 鱼明胶, 0.1ug/ML 热休克蛋白-70, 10uM E64, 5% 甘油, 1ug/ML HRP-蛋白 A 和 0.5ug/ML HRP-山羊抗鼠 IgG-Fc 抗体。
- 快捷洗涤液: 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH=8, 0.5M NaCl, 0.3% Tween-20。
- 封闭缓冲液 (用于常规免疫检测): PBS 添加 3% 脱脂奶粉。
- 常规免疫检测缓冲液: PBS 添加 0.05% Tween20。
- 抗原: GST 蛋白。
- 一级抗体: 兔 IgG 抗 GST。
- 二级抗体: HRP-山羊抗兔子全 IgG 抗体。
- 底物: Chemiluminescent (Amersham-生命科学公司的 ECL 试剂盒)。
- 固相: 硝酸盐纤维素膜(NC 膜) (8 X10 cm²)。

样品处理:

- 将两组经系列稀释的 GST 蛋白按图示的位置和数量加样(每孔槽 1.2-100ng) 在 10%的 SDS-凝胶上电泳, 然后经 Western-Transfer 转移到一硝酸盐纤维素膜(NC 膜)上, 将此 NC 膜切成两片, 其中一片用一步快捷法进行免疫检测, 另一片用常规法进行免疫检测。

快捷免疫检测:

1. 添加10ug上述一级抗体 (兔子抗GST抗体)于10ML一步快捷反应液中; 混匀后将此溶液直接与未经封闭的NC膜(膜1)一起在室温下孵育30分钟并伴随温和摇动。注意: 溶液必须盖过膜。
2. (选择)回收该添加有一级抗体的一步快速反应液以备将来重复使用, 但只能用来检测同样的抗原 (一般可重复使用5次)。
3. 取出膜用50毫升上述的快捷洗涤液漂洗一次1分钟, 然后用100毫升10X稀释的快捷洗涤液或蒸馏水荡洗两次(10秒钟)。
4. 用Amersham生命科学的ECL试剂盒的Chemiluminescent作为底物显色大约30, 秒按制造商指示进行操作。

常规免疫检测:

1. 用上述的封闭缓冲液在室温封闭 NC 膜(膜 2)2 个小时。
2. 用 PBS/0.05% Tween20 洗涤膜三次。
3. 在 10ml 常规免疫检测缓冲液(PBS/0.05% Tween20)中添加 10ul 兔子抗 GST 一级抗体, 混匀后将此溶液与经上述封闭的 NC 膜(膜 2)一起在室温下孵育 2 个小时 并伴随温和摇动。注意: 溶液必须盖过膜。
4. 用 PBS/0.05% Tween20 洗涤膜三次。

5. 在 10ml 常规免疫检测缓冲液(PBS/0.05% Tween20)中添加 10ul HRP-山羊抗兔二级抗体,混匀后将此溶液与 NC 膜(膜 2)一起在室温下孵育 1 个小时 并伴随温和摇动。注意:溶液必须盖过膜。
6. 用 PBS/0.05% Tween20 洗涤膜三次。
7. 用 Amersham 生命科学的 ECL 试剂盒的 Chemiluminescent 作为底物显色大约 30, 秒按制造商指示进行操作。

结果:

如图 4 所示,上述的两种方法检测相似结果,但试时间和程序大不相同:快捷法只要 30 多分钟及 3 个步骤,而常规的方法需要 5 个多小时及 7 个步骤。

实例 3

快捷免疫检测法在间接 ELISA 中的应用及与常规 ELISA 之比较

材料:

- 一步快捷反应液: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH=8, 30mM EDTA 钠盐, 0.5M NaCl, 0.05% 叠氮化钠, 50ug/ML Ampicillin, 5mg/ML MgCl₂, 5% 鱼明胶, 0.1ug/ML 热休克蛋白-70, 0.5ug/ML HRP-山羊抗兔 IgG-Fc 抗体和 0.5ug/ML HRP-山羊抗鼠 IgG-Fc 抗体。
- 快捷洗涤液: 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH=8, 0.5M NaCl, 0.2% Tween-20。
- 封闭缓冲液 (用于常规免疫检测): PBS 添加 3%脱脂奶粉。
- 常规免疫检测缓冲液: PBS 添加 0.05%Tween20。
- 抗原: GST 蛋白。
- 一级抗体: 兔 IgG 抗 GST。
- 二级抗体: HRP-山羊抗兔全 IgG 抗体。
- 底物: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzine (TMB) (SIGMA 公司产品: T8665)。
- 终止液: 1N HCl。
- 固相: 96-孔 microtiter ELISA 盘。

样品处理:

包埋: 用 PBS 缓冲液系列稀释抗原蛋白 GST 成八个的不同浓度, 从 30ng 开始 3X 稀释至 0.04 和 0.00ng/ml。将此稀释液添加到 96-孔的 ELIS 盘中(每槽 100ul)并孵育二个 小时, 然后除去包埋溶液并用快捷洗涤液(每次每槽 150ul)洗涤三次。

快捷免疫检测:

添加 10ug 上述一级抗体 (兔子抗 GST 抗体) 于 10ML 一步快捷反应液中; 混匀后将此溶液直接添加在包埋了抗原的系列孔槽中(无需预封闭), 每槽添加 100ul, 然后在室温孵育 30 分钟。

选择回收该添加有一级抗体的一步快捷反应液以备将来重复使用, 但只能用来检测同样的抗原 (一般可重复使用 5 次)。

用快捷洗涤液(200ml/槽)洗涤孔槽三次。

在每个槽里加 100ul TMB 底物并孵育 1-5 分钟, 至理想颜色显出后再加 100ul 的终止液 (1N HCl), 然后用 microtiter 读盘仪在 450nm 测定 OD。

常规的免疫检测:

1. 用上述的封闭缓冲液(200ul/槽)在室温封闭包埋有抗原的孔槽 2 个小时。
2. 用 PBS/0.05% Tween20 洗涤孔槽三次。
3. 在 10ml 常规免疫检测缓冲液(PBS/0.05% Tween20)中添加 10ul 兔子抗 GST 一级抗体, 混匀后将此溶液与经上述封闭的孔槽在室温下孵育 2 个小时并伴随温和摇动。
4. 用 PBS/0.05% Tween20 洗涤孔槽三次。
5. 在 10ml 常规免疫检测缓冲液(PBS/0.05% Tween20)中添加 10ul HRP-山羊抗兔二级抗体, 混匀后将此溶液与孔槽一起在室温下孵育 1 个小时 并伴随温和摇动。

6. 用 PBS/0.05% Tween20 洗涤孔槽三次。
7. 在每个槽里加 100ul TMB 底物并孵育 1-5 分钟, 至理想颜色显出后再加 100ul 的终止液 (1N HCl), 然后用 microtiter 读盘仪在 450nm 测定 OD。

结果:

如图 5 所示, 上述的快捷 ELISA 和常规 ELISA 两种方法检测结果相近且具有可比性, 但测试时间和程序大不相同: 快捷 ELISA 法只要 30 多分钟及 3 个步骤, 而常规 ELISA 法需要 5 个多小时及 7 个步骤。

实例 4

快捷免疫检测法在俘获 ELISA 中的应用

材料:

- 一步快捷反应液: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH=8, 30mM EDTA 钠盐, 0.5M NaCl, 0.05% 叠氮化钠, 50ug/ML Ampicillin, 5mg/ML MgCl₂, 10mg/ml BSA, 0.1ug/ML 热休克蛋白-70, 0.5ug/ML HRP-兔抗鼠 IgG-Fc 抗体。
- 快捷洗涤液: 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH=8, 0.5M NaCl, 0.2% Tween-20。
- 抗原: 人 TNF- α 。
- 俘获抗体: 兔 IgG 抗人 TNF- α 。
- 一级抗体: 鼠 IgG 抗人 TNF- α 。
- 底物: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (SIGMA 公司产品: T8665)。
- 终止液: 1N HCl。
- 固相: 96-孔 microtiter ELISA 盘。

样品处理:

包埋: 用 50mM 的碳酸盐碳酸氢盐缓冲液 pH=9.6, 稀释俘获抗体(兔抗人 TNF- α) 至 10ng/ul 的浓度。将此稀释液添加到 96-孔的 ELIS 盘中(每槽 100ul)并在室温孵育二小时, 然后除去包埋溶液并用快捷洗涤液(每次每槽 200ul)洗涤三次。

快捷免疫检测:

1. a. 在 10 ML 的一步快捷反应液中添加 5ug 一级抗体并混匀。b. 用此含有一级抗体的一步快捷反应液溶解抗原人 TNF- α 并且配制成下述的不同浓度: 100ng/ml, 33ng/ml, 11ng/ml, 3.6ng/ml, 1.2ng/ml, 0.4ng/ml, 0.13ng/ml 和 0.00ng/ml, 各 200ul。c. 然后按 100ul/槽, 将此不同浓度的混合液直接与包埋有俘获抗体的孔槽(无需预封闭)在室温孵育 60 分钟。
2. 用快捷洗涤液每槽 200ul, 洗涤孔槽三次。
3. 在每个槽里加 100ul TMB 底物并孵育 1-5 分钟, 至理想颜色显出后再加 100ul 的终止液 (1N HCl), 然后用 microtiter 读盘仪在 450nm 测定 OD。

结果:

如图 6 所示, 通用快捷免疫检测法不仅适合于间接 ELISA(实例 5)也适合于俘获 ELISA。在俘获 ELISA 的程序中快捷免疫检测法将封闭, 抗原结合, 一级抗体结合, 二级抗体结合合并成一步快捷的反应而不须使用预标记的一级抗体(大多数常规的俘获 ELISA 使用预标记的一级抗体)。

实例 5

应用通用快捷免疫检测法检测受体蛋白与配体结合的能力

材料:

- 一步快捷反应液: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH=8, 30mM EDTA 钠盐, 0.5M NaCl, 0.05% 叠氮化钠, 50ug/ML Ampicillin, 5mg/ML MgCl₂, 10mg/ml BSA, 0.1ug/ML 热休克蛋白-70, 0.5ug/ML HRP-山羊抗人 IgG-Fc 抗体。
- 快捷洗涤液: 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH=8, 0.5M NaCl, 0.2% Tween-20。
- 俘获蛋白(配体): 人 TNF- α 。

- 待测受体：人 Fc-融合人 TNF- α 受体 (TNFR1I-Fc)。
- 底物：3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (SIGMA 公司产品：T8665)。
- 终止液：1N HCl。
- 固相：96-孔 microtiter ELISA 盘。

样品处理：

包埋：用 50mM 的碳酸盐碳酸氢盐缓冲液 pH=9.6，稀释俘获蛋白(人 TNF- α) 至 10ng/ul 的浓度。将此稀释液添加到 96-孔的 ELISA 盘中(每槽 100ul)并在室温孵育二小时，然后除去包埋溶液并用快捷洗涤液(每次每槽 200ul)洗涤三次。

快捷免疫检测：

1. 用一步快捷反应液溶解 Fc-融合受体 (TNFR1I-Fc) 并且配制成下述的不同浓度：100ng/ml, 33ng/ml, 11ng/ml, 3.6ng/ml, 1.2ng/ml, 0.4ng/ml, 0.13ng/ml 和 0.00ng/ml, 各 200ul；然后按 100ul/槽(每浓度分析两次)，将此不同浓度的混合液直接与包埋有配体人 TNF- α (作为俘获蛋白)的孔槽(无需预封闭)在室温孵育 30 分钟。
2. 用快捷洗涤液每槽 200ul，洗涤孔槽三次。
3. 在每个槽里加 100ul TMB 底物并孵育 1-5 分钟，至理想颜色显出后再加 100ul 的终止液 (1N HCl)，然后用 microtiter 读盘仪在 450nm 测定 OD。

结果：

本实验使用通用快捷的免疫检测法考查了在一系列不同浓度下 TNF- α 受体蛋白与配体结合的能力。如图 7 中所示，其结果证明通用快捷免疫检测法适于受体蛋白与配体结合相关检测。这种快捷的方法成功地将封闭，受体蛋白结合于配体，检测抗体结合于受体蛋白合并成一步反应。这个实验也是使用含有人工片段的受体蛋白的一个实例 (本例中受体蛋白的 Fc 片段是一个可被一步快捷反应液中的特异性指示剂所识别一人工融合片段)。

实例 8

通用快捷免疫细胞化学检测法与常规免疫细胞化学检测法的比较

材料：

- 一步快捷反应液：50mM Tris-HCl 缓冲液，pH8，30mM EDTA 钠盐，0.5M NaCl，0.05% 叠氮化钠，50ug/ML Ampicillin，5mg/ML MgCl₂，10mg/ML BSA，3ul/ml 蛋白酶抑制剂鸡尾酒溶液(SIGMA 公司，P1860)，20ug/ML HRP-山羊抗鼠 IgG-Fc 抗体。
- 快捷洗涤液：50mM Tris-HCl 缓冲液 pH=8，0.5M NaCl，0.3% Tween-20。
- 封闭缓冲液：(用于常规免疫检测)：PBS 添加 1%BSA。
- 常规免疫检测缓冲液：PBS。
- 抗原：表达于 CHO 细胞中的 Tag-flag 融合蛋白。
- 一级抗体：鼠抗 flag 抗体。
- 二级抗体：HRP-山羊抗鼠全 IgG 抗体。
- 底物：Diaminobenzidine (DAB) (SIGMA 公司的产品 D4418)。
- 反衬染色试剂：Mayer's hematoxylin。
- 固相：免疫组化用玻片。

样品处理：

将表达基因重组蛋白 Tat-Flag 的 CHO 细胞沉淀并固定在免疫组化用的玻片上 (500,000 个细胞/玻片)，然后用 3%过氧化氢处理使内生的过氧化氢酶失活。

快捷免疫检测：

1. 添加10ug上述一级抗体 (鼠抗flag 抗体)于1ML(足够于5 个玻片)一步快捷反应液中，混匀后，将此溶液(200ul/玻片)直接覆盖于经上述预处理并固定在玻片的细胞，在室温下孵育30分钟。
2. 用2 ML快捷洗涤液漂洗玻片3次，用2ML蒸馏水液漂洗玻片1次。
3. 用DAB底物与玻片一起孵育并显色大约2分钟至理想的颜色出现，然后用足够的

蒸馏水洗涤玻片以终止显色。

4. 将玻片置于 Mayer's hermatoxyin 溶液中在室温反染色(Counterstaining) 3 分钟, 用蒸馏水温和地洗涤玻片, 然后在显微镜下拍照。

常规免疫检测:

1. 用封闭缓冲液(200ul/玻片)在室温下封闭玻片 2 小时。
2. 用 3ML PBS 洗涤玻片三次。
3. 用 PBS/1% BSA 溶液按 100/1 稀释一级抗体, 将此一级抗体溶液 (200ul/玻片) 覆盖于玻片上在室温孵育 2 个小时。
4. 用 3ML PBS 洗涤玻片三次。
5. 用 PBS/1% BSA 溶液按 100/1 稀释二级抗体, 将此二级抗体溶液 (200ul/玻片) 覆盖于玻片上在室温孵育 1 个小时。
6. 用 3ML PBS 洗涤玻片三次。
7. 用 DAB 底物与玻片一起孵育并显色大约 2 分钟至理想的颜色出现, 然后用足够的蒸馏水洗涤玻片以终止显色。
8. 将玻片置于 Mayer's hermatoxyin 溶液中在室温反染色(Counterstaining) 3 分钟; 用蒸馏水温和地洗涤玻片, 然后在显微镜下拍照。

结果:

本实验在免疫细胞化学检测(immunocytochemistry)中分别用通用快捷法和常规法测定一基因重组的融合蛋白 Tat-Flag 在 CHO 细胞中表达情况。两种方法的测定结果非常相似, 但是测试时间和程序是大不同相的: 通用快捷法只需 30 分钟和 4 步骤, 而常规法需要 5 个小时和 8 步骤。

图 1

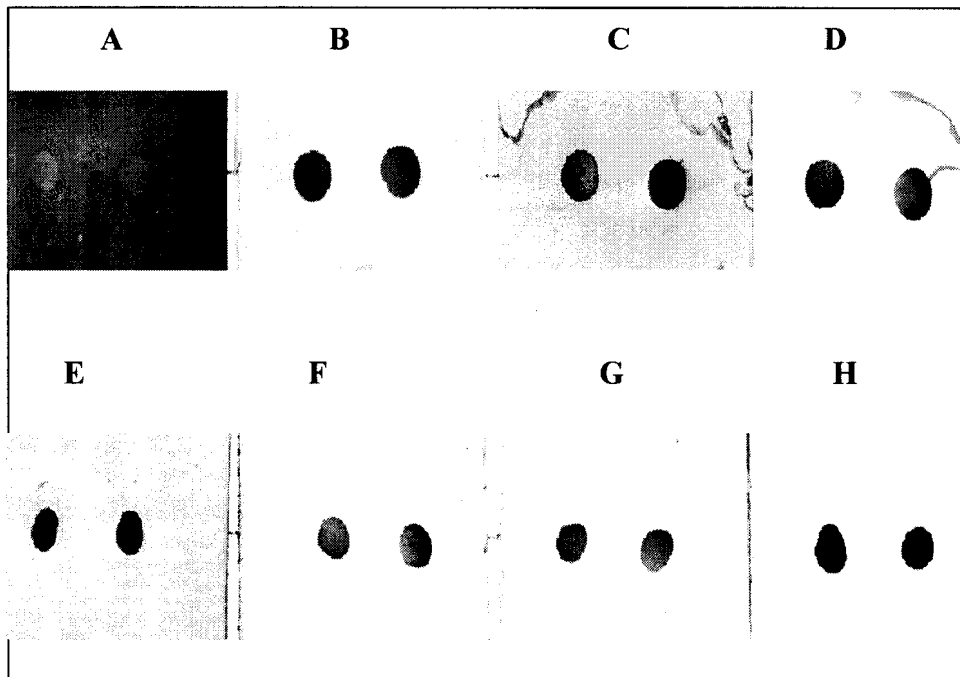


图 2

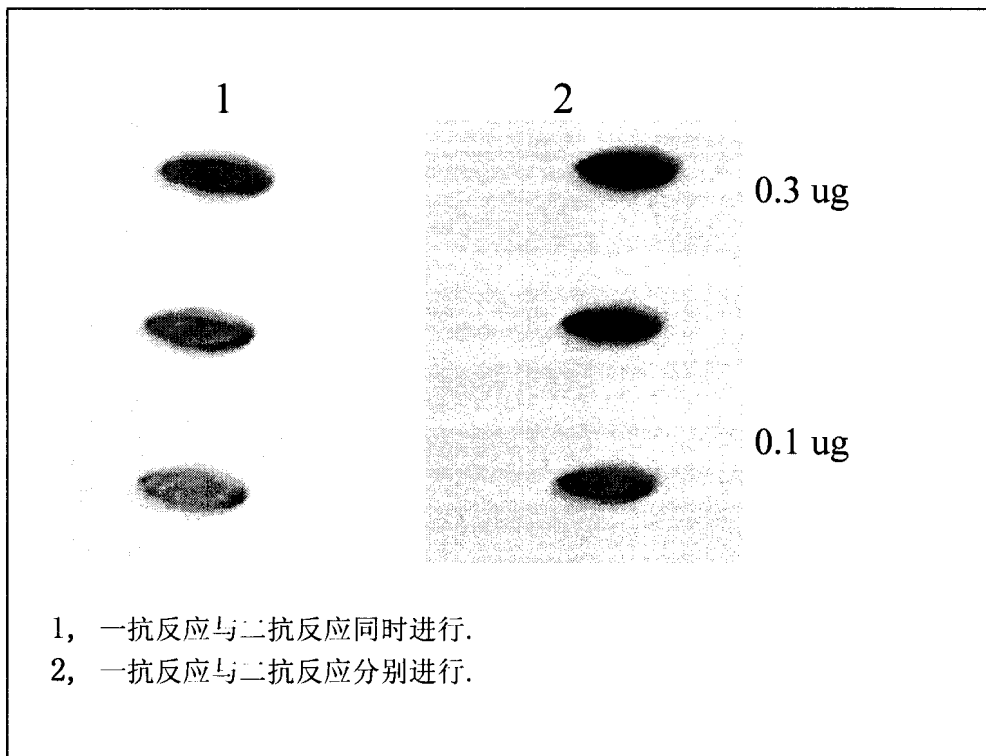


图 3

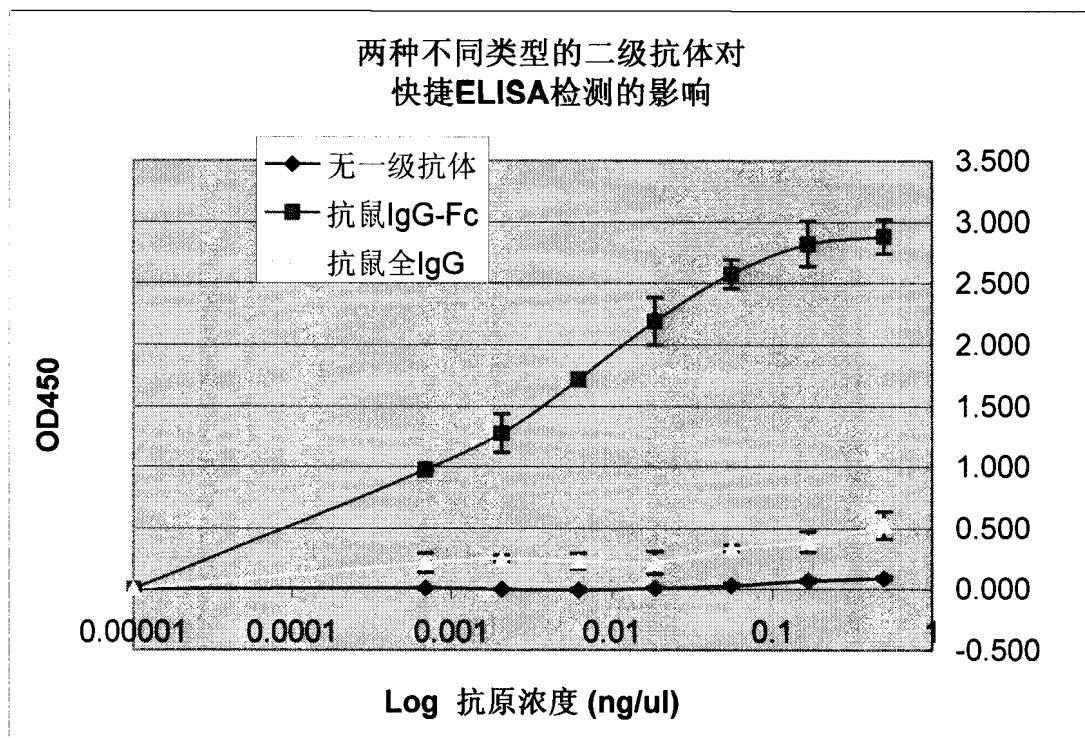


图 4

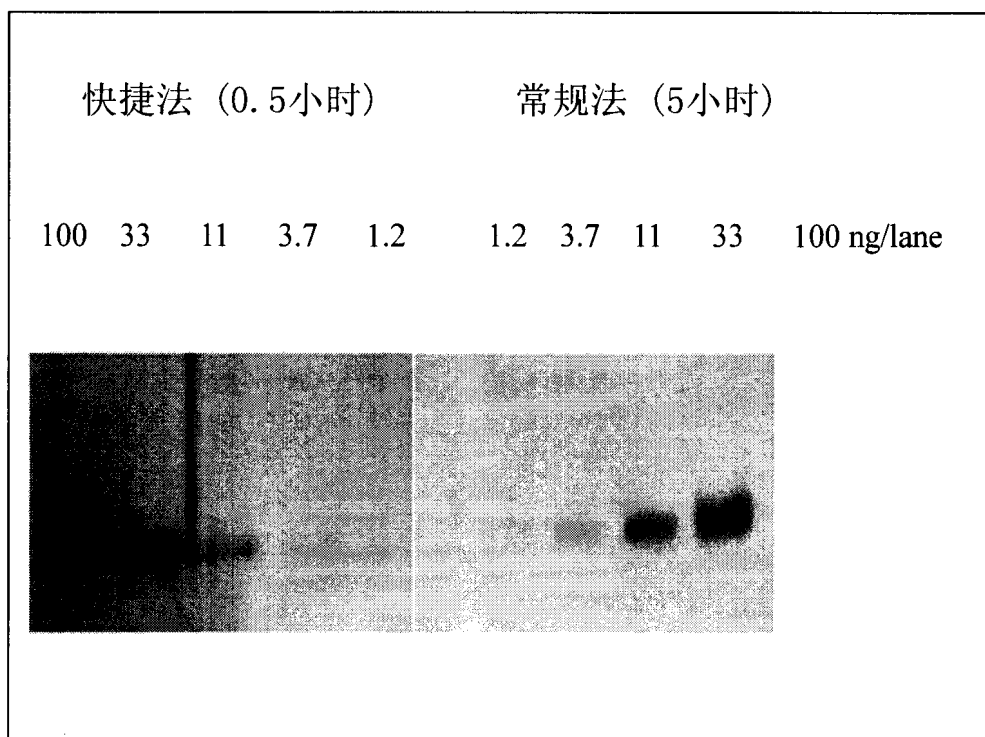


图 5

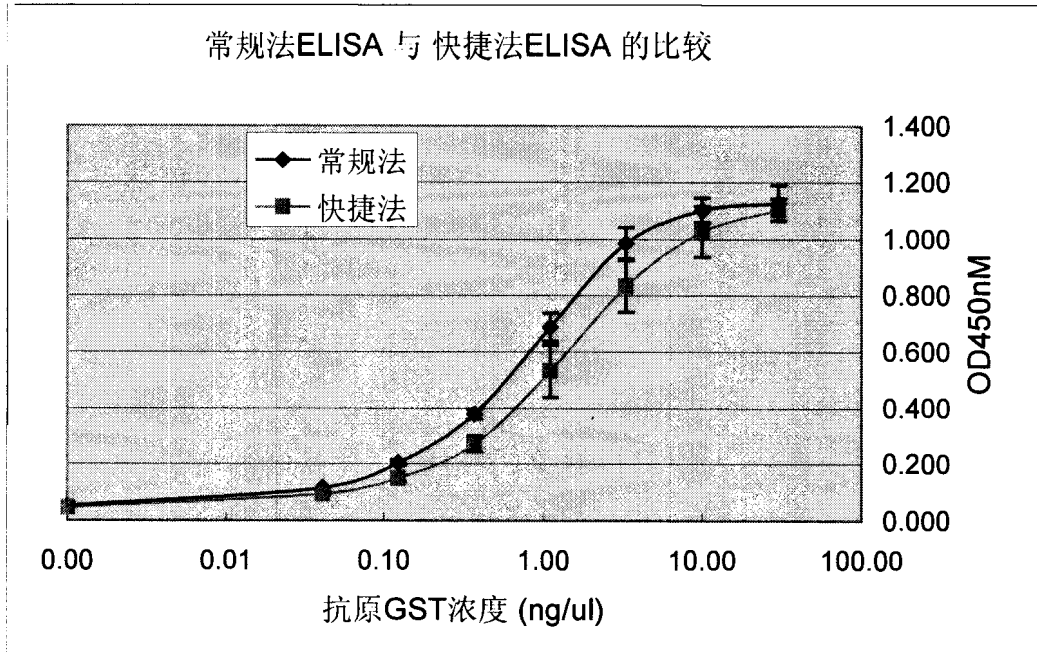


图 6

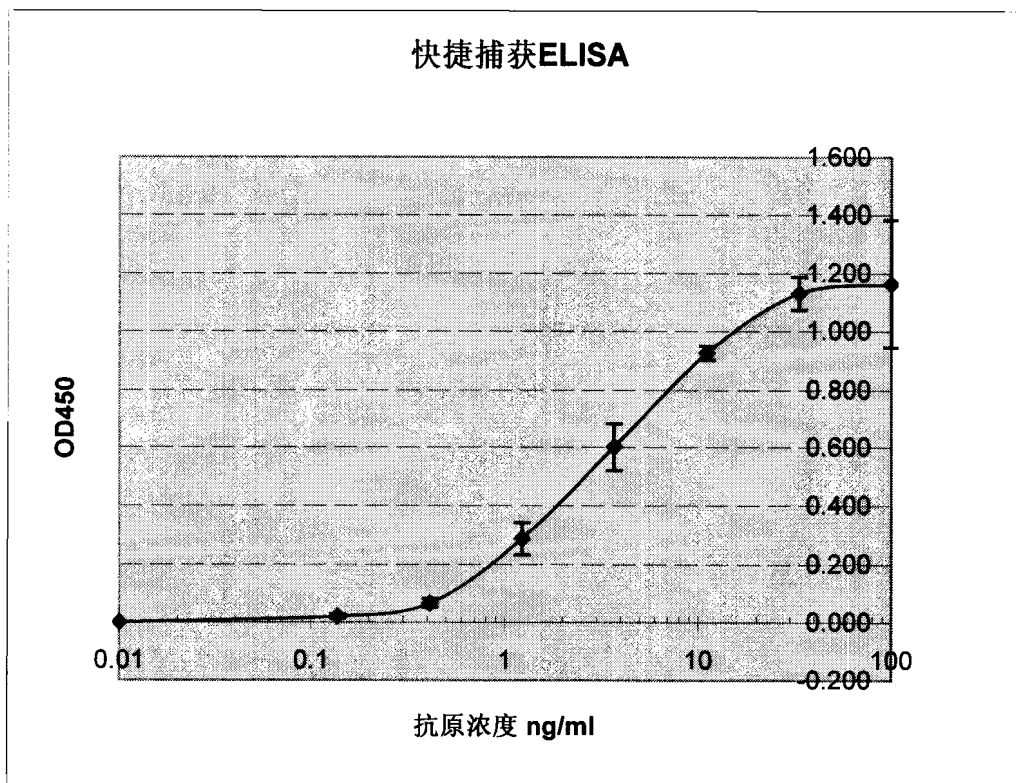


图 7

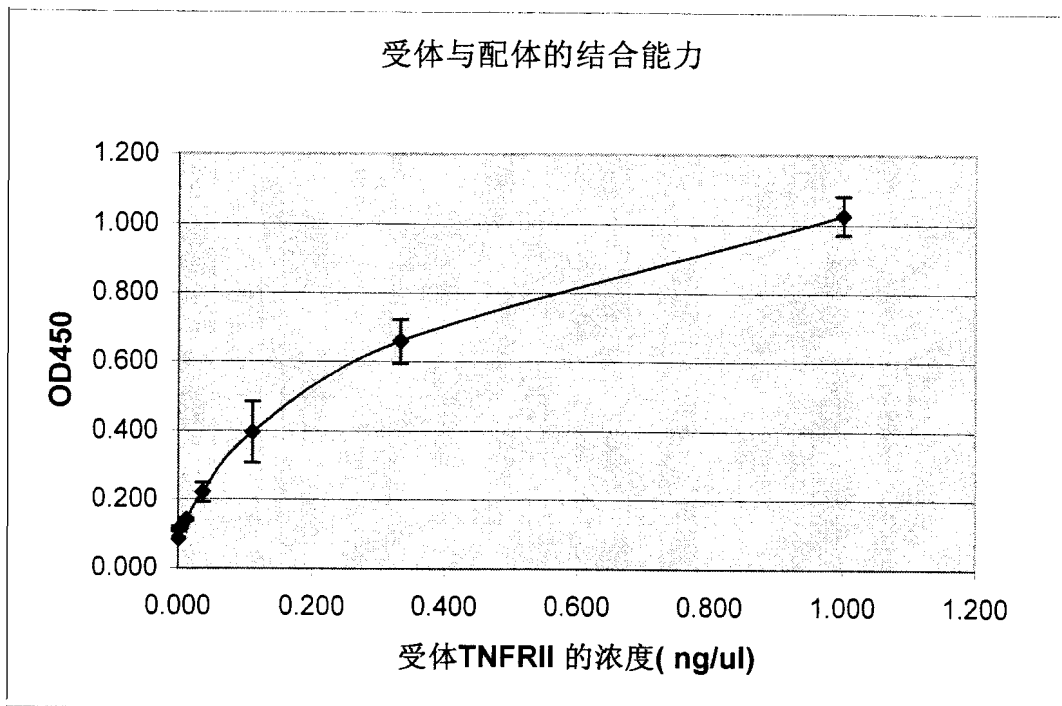
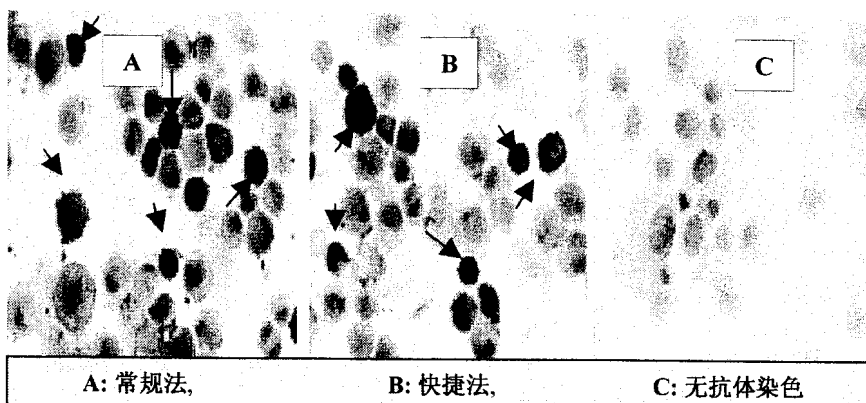


图 8



专利名称(译)	通用快捷的免疫检测法及试剂和试剂盒		
公开(公告)号	CN101421619A	公开(公告)日	2009-04-29
申请号	CN200580009417.3	申请日	2005-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	邹松		
申请(专利权)人(译)	邹松		
当前申请(专利权)人(译)	邹松		
[标]发明人	邹松 邹冉		
发明人	邹松 邹冉		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/537		
CPC分类号	G01N33/543		
代理人(译)	蔡学俊		
优先权	60/556065 2004-03-25 US 11/089059 2005-03-24 US		
其他公开文献	CN101421619B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一套新的免疫检测方法，试剂盒、试剂及其应用。本发明的特征在于：通过组合下述试剂中的至少两个非特异非竞争剂，特异性指示剂，一级抗体和抗原便可提供一便捷的免疫检测方法；该便捷的免疫检测法至少可以将下述步骤中的两个步骤：封闭、一级抗体结合、二级抗体结合，合并成一步反应。本发明的显著特征是将常规免疫检测中的步骤：封闭，一级抗体结合，二级抗体结合三个单独步骤合并成一步反应，并在一次反应中在固相上形成可检测的复合体，抗原 - 一级抗体 - 特异性指示剂或配体 - 受体 - 特异性指示剂。

