



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105738616 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201610072237.X

(22)申请日 2016.02.02

(71)申请人 基蛋生物科技股份有限公司

地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业开发区博富路9号

(72)发明人 金晶 黄力 杜腾飞 罗雅赛
苏恩本

(74)专利代理机构 常州佰业腾飞专利代理事务所(普通合伙) 32231

代理人 陈书华

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

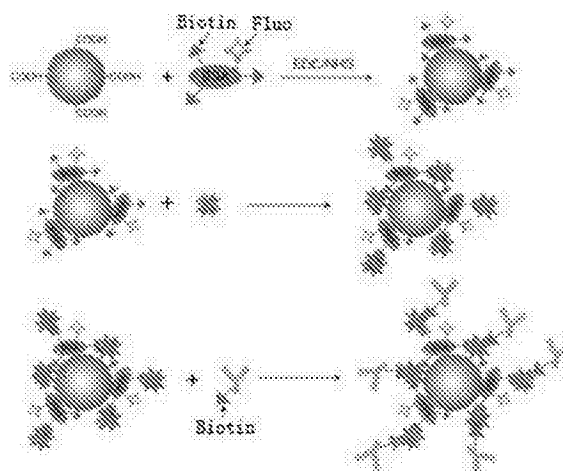
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法

(57)摘要

本发明涉及一种双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法,属于荧光免疫层析体外诊断中的荧光标记领域。该双重放大荧光免疫标记探针的制备方法包括如下步骤:步骤一:生物素化待测物质探测分子和生物素化载体的制备;步骤二:修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球的制备;步骤三:双重放大荧光免疫标记探针的制备。本发明双重放大荧光免疫标记探针,将增强荧光强度和增加荧光微球的探测分子结合量两种方式有效结合,利用生物素亲合素间结合作用实现一次放大,同时利用载体在荧光微球外添加荧光强度实现另一次放大,双重放大模式极大的提升了荧光免疫分析荧光信号强度。



1. 双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一:取购置的活化生物素,其中四分之一的活化生物素同待测物质探测分子进行混合反应,四分之三的活化生物素同载体进行混合反应,均室温下搅拌1~2小时,然后在PBS缓冲液透析袋中透析48~72小时,得生物素化待测物质探测分子和生物素化载体,其中PBS缓冲液的摩尔浓度为10mM,pH为7.4;

步骤二:取步骤一制得的生物素化载体,用NaHCO₃调节pH至8~9后,加小分子荧光染料,室温搅拌反应1~2小时,反应结束后,用纯化树脂除去未反应的小分子荧光染料,再加入荧光微球,室温搅拌反应1~2小时,于1100g下离心3~5分钟,收集离心后溶液,获得修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球;

步骤三:将步骤二制得的修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球与链亲和素混合,室温反应1~2小时,加入步骤一制得的生物素化待测物质探测分子,继续反应1~2小时,即得所述双重放大荧光免疫标记探针。

2. 根据权利要求1所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,步骤一所述待测物质为抗原或抗体类蛋白质或多肽,所述载体为牛血清白蛋白、酪蛋白或超支化聚合物类物质。

3. 根据权利要求1所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,步骤一中所述活化的生物素、待测物质探测分子、载体的摩尔比为4:1:3。

4. 根据权利要求1所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,步骤二中所述生物素化载体、荧光微球的摩尔比为1:1。

5. 根据权利要求1所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,步骤二中所述NaHCO₃溶液的质量浓度为10%,所述小分子荧光染料同荧光微球荧光光谱相同。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,步骤三中所述修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球、链亲和素、生物素化待测物质探测分子的摩尔比为1:5:5。

7. 用权利要求1制得的双重放大荧光免疫标记探针制备检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析试剂条的方法,其特征在于,包括如下制备步骤:

步骤一:样品垫的制备:用缓冲液溶解蛋白,加入表面活性剂,其中,每100mL缓冲液加入0.01~0.05g表面活性剂,调节pH为6~8,以每30cm长样品垫使用2~5mL上述液体的比例,将上述溶液均匀涂布在样品垫上,20~25℃干燥8~12小时即可;

步骤二,结合垫的制备:与步骤一处理样品垫的方式相同,先对结合垫进行处理,后将制备的双重放大荧光免疫标记探针用PBS缓冲液稀释3000倍,均匀的喷于结合垫上,于20~25℃干燥4~8小时即可,其中,所述PBS缓冲液的摩尔浓度为10mM,pH为7.4,含2%BSA和2%蔗糖;

步骤三,硝酸纤维素膜的处理:

A. 检测线的制备:将心肌肌钙蛋白I相对应的捕获单克隆抗体或多克隆抗体用20mmol/L、pH7.2的PB缓冲液稀释到2.0mg/mL的浓度,0.8uI/cm在硝酸纤维素膜上划线得检测线,干燥箱内20~25℃鼓风干燥8~12h即得;

B. 质控线的制备:兔抗鼠IgG抗体按4mg/mL的浓度,0.8uI/cm在硝酸纤维素膜上划质控线,该线与检测线间隔平行,干燥箱内20~25℃鼓风干燥8~12h即得;

步骤四,吸水垫的制备:吸水纸裁剪成30*2.7cm每条,即可;

步骤五,组装:将所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫顺次贴在底板上,其中,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分之间需重迭1~2mm,后用斩切机切成一定宽度的试剂条,20~25℃鼓风干燥8~12h,即得所述荧光免疫层析试剂条。

8.根据权利要求7所述的用双重放大荧光免疫标记探针制备检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析试剂条的方法,其特征在于,步骤一中所述缓冲液为10mM,pH为7.2~7.4的PBS,Tris或甘氨酸缓冲液,用所述缓冲液溶解5mg/mL的BSA或酪蛋白。

9.根据权利要求7所述的用双重放大荧光免疫标记探针制备检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析试剂条的方法,其特征在于,步骤一中所述表面活性剂为吐温20或聚乙二醇辛基苯基醚。

10.权利要求1所述的双重放大荧光免疫标记探针在荧光免疫检测中的应用。

双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法

技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫层析体外诊断中的荧光标记领域,具体涉及一种双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法。

背景技术

[0002] 免疫检测技术是目前医学、生物学、食品安全等领域最基本也是最常用的检测手段之一,该技术基于抗体与抗原间特异性反应原理对待测物进行定性定量分析,广泛应用于医学生物学基础研究、医学临床、环境监测、疾病诊断、疾病发展预测甚至是食品和微生物污染的检测中。

[0003] 荧光免疫分析技术是利用荧光物质标记抗原或抗体分子,通过与待测物分子特异性免疫结合后检测荧光信号的强度变化,实现对目标分析物的定性和定量判断。

[0004] 在进行免疫检测或者是荧光免疫分析过程中,低浓度的抗原的检测依然是临床诊断和检验检疫领域的重大问题,上述分析方法在应对非常微量的物质检测时,经常存在信号低、噪声干扰大、传统方法难以检出的难题,因此,发展新的免疫标记技术或新的检测手段,提高检测灵敏度是目前分析检测领域发展的迫切要求。

[0005] 目前,在荧光免疫分析领域,常用的放大手段包括生物素~亲和素放大体系,1981年,Hsu等证明了一个亲合素可以同时结合四个生物素分子,并对两者在免疫学中应用的方法做了详细介绍,通过链亲合素~生物素的桥接作用,分别结合抗原抗体、标记物质或荧光微球等,能极大地增强抗体结合量或荧光结合量,起到放大的作用。

[0006] 中国专利CN201310470907X介绍了一种信号放大型荧光探针及其制备方法及应用,其中一种放大方式即是利用生物素和亲合素直接的结合作用实现的,但是该方法仅仅针对抗体结合量的增加和放大,在面对某些更微量的指标检测时检测低值可能不能检出。

[0007] 一般的生物素、亲合素放大体系均采用的一种放大模式,仅仅利用到生物素和亲合素间的放大效果,不能有效将生物素和亲合素放大模式充分利用起来,往往在面对一些痕量检测时会显得束手无策。

发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的不足而提供一种双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法,该双重放大荧光免疫标记探针利用增强荧光强度和增加探测分子结合量两种放大模式,使得荧光免疫检测试剂盒荧光强度较以往有更大的放大倍数,检测低值大大降低,实现痕量检测。

[0009] 本发明技术方案如下:

[0010] 双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,包括如下步骤:

[0011] 步骤一:取购置的活化生物素,其中四分之一的活化生物素同待测物质探测分子进行混合反应,四分之三的活化生物素同载体进行混合反应,均室温下搅拌1~2小时,然后

在PBS缓冲液透析袋中透析48~72小时,得生物素化待测物质探测分子和生物素化载体,其中PBS缓冲液的摩尔浓度为10mM,pH为7.4;

[0012] 步骤二:取步骤一制得的生物素化载体,用 NaHCO_3 调节pH至8~9后,加小分子荧光染料,室温搅拌反应1~2小时,反应结束后,用纯化树脂除去未反应的小分子荧光染料,再加入荧光微球,室温搅拌反应1~2小时,于1100g下离心3~5分钟,收集离心后溶液,获得修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球;

[0013] 步骤三:将步骤二制得的修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球与链亲和素混合,室温反应1~2小时,加入步骤一制得的生物素化待测物质探测分子,继续反应1~2小时,即得所述双重放大荧光免疫标记探针。

[0014] 更进一步的,所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其中步骤一中所述待测物质为抗原或抗体类蛋白质或多肽,所述载体为牛血清白蛋白、酪蛋白或超支化聚合物类物质。

[0015] 更进一步的,所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其中步骤一中所述活化的生物素、待测物质探测分子、载体的摩尔比为4:1:3。

[0016] 更进一步的,所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其中步骤二中所述生物素化载体、荧光微球的摩尔比为1:1。

[0017] 更进一步的,所述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其中步骤二中所述 NaHCO_3 溶液的质量浓度为10%,所述小分子荧光染料同荧光微球荧光光谱相同。

[0018] 更进一步的,上述的双重放大荧光免疫标记探针的制备方法,其中步骤三中所述修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球、链亲和素、生物素化待测物质探测分子的摩尔比为1:5:5。

[0019] 用所述的双重放大荧光免疫标记探针制备检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析试剂条的方法,包括如下制备步骤:

[0020] 步骤一:样品垫的制备:用缓冲液溶解蛋白,加入表面活性剂,其中,每100mL缓冲液加入0.01~0.05g表面活性剂,调节pH为6~8,以每30cm长样品垫使用2~5mL上述液体的比例,将上述溶液均匀涂布在样品垫上,20~25℃干燥8~12小时即可;

[0021] 步骤二,结合垫的制备:与步骤一处理样品垫的方法相同,先对结合垫进行处理,后将制备的双重放大荧光免疫标记探针用PBS缓冲液稀释3000倍,均匀的喷于结合垫上,于20~25℃干燥4~8小时即可,其中,所述PBS缓冲液的摩尔浓度为10mM,pH为7.4,含2%BSA和2%蔗糖;

[0022] 步骤三,硝酸纤维素膜的处理:

[0023] A.检测线的制备:将心肌肌钙蛋白I相对应的捕获单克隆抗体或多克隆抗体用20mmol/L、pH7.2的PB缓冲液稀释到2.0mg/mL的浓度,0.8uI/cm在硝酸纤维素膜上划线得检测线,干燥箱内20~25℃鼓风干燥8~12h即得;

[0024] B.质控线的制备:兔抗鼠IgG抗体按4mg/mL的浓度,0.8uI/cm在硝酸纤维素膜上划质控线,该线与检测线间隔平行,干燥箱内20~25℃鼓风干燥8~12h即得;

[0025] 步骤四,吸水垫的制备:吸水纸裁剪成30*2.7cm每条,即可;

[0026] 步骤五,组装:将所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫顺次贴在底板上,其中,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分之间需重叠1~2mm,后用斩切机切成一

定宽度的试剂条,20~25℃鼓风干燥8~12h,即得所述荧光免疫层析试剂条。

[0027] 更进一步的,所述的用双重放大荧光免疫标记探针制备检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析试剂条的方法,其中步骤一中所述缓冲液为10mM,pH为7.2~7.4的PBS,Tris或甘氨酸缓冲液,用所述缓冲液溶解5mg/mL的BSA或酪蛋白。

[0028] 更进一步的,所述的用双重放大荧光免疫标记探针制备检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析试剂条的方法,其中步骤一中所述表面活性剂为吐温20(Tween20)或聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。

[0029] 所述的双重放大荧光免疫标记探针在荧光免疫检测中的应用。

[0030] 所述的荧光微球连接载体可任意选择物理吸附、共价偶联以及结合对中的一种实现。

[0031] 有益效果:本发明双重放大荧光免疫标记探针,在体外诊断免疫检测中将增强荧光强度和增加荧光微球的探测分子结合量两种方式的有效结合,利用生物素亲合素间结合作用实现一次放大,同时利用载体在荧光微球外添加荧光强度实现另一次放大,双重放大模式极大的提升了荧光免疫分析荧光信号强度,检测灵敏度和检测范围等免疫分析试剂性能得到显著增强。

附图说明

[0032] 图1为本发明双重放大荧光免疫标记探针的双重放大原理示意图;

[0033] 图2为本发明制得的荧光免疫层析试剂条的结构示意图;

[0034] 图3为本发明制得的荧光免疫层析试剂条的检测范围示意图;

[0035] 图4为本发明制得的荧光免疫层析试剂条的相关性示意图;

[0036] 其中,1、底板;2、样品垫;3、结合垫;4、硝酸纤维素膜;5、吸水垫;6、检测线7、质控线。

具体实施方式

[0037] 以下通过实施例进一步对本发明予以说明,但并不以此为限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡事未脱离本发明技术方案内容,根据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

[0038] 实施例一:双重放大荧光微球的制备

[0039] 1.1取20mmol购置的活化的生物素,其中5mmol活化的生物素与5mmol待测物质探测分子混合反应(本实施例以心肌肌钙蛋白I(cTnI)抗体为例),15mmol活化的生物素与15mmol牛血清蛋白混合反应,室温搅拌1~2小时,然后置盛有PBS缓冲液(10mM pH7.4)的透析袋中透析48~72小时,得生物素化cTnI抗体和生物素化牛血清蛋白。

[0040] 1.2取20μL上述步骤制得的生物素化牛血清蛋白,用10%NaHCO₃调节pH至8~9,加入同荧光微球荧光光谱性质相同的小分子荧光染料,轻柔搅拌室温反应1~2小时,反应结束后,用纯化树脂出去未反应的荧光染料,再以1:1摩尔比加入荧光微球,室温搅拌反应1~2小时,1100g离心3~5分钟,收集离心后溶液,获得修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球。

[0041] 1.3将1.2制备的修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球与链亲和素按1:5的摩尔比混合,室温反应1~2小时,再加入1.1中制备的生物素化cTnI抗体,继续反应1~2小时,其中生物素化荧光微球、链亲和素和生物素化cTnI抗体摩尔比例为1:5:5,反应结束后,获得了增强荧光强度和增加抗体结合量的双重放大荧光微球。

[0042] 实施例二:荧光免疫层析诊断试剂条的制备

[0043] 如图2所示,一种检测心肌肌钙蛋白I的荧光免疫层析试剂条,包括底板1,在底板上顺次贴上样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;其中样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5各部件连接处重叠1~2mm,保证检测样本顺利从样本区通过结合垫到达检测区,各部件的制备方法如下所述:

[0044] 2.1样品垫2的制备:用10mM,pH7.2~7.4的PBS缓冲液100mL溶解0.5g的BSA蛋白,然后加入0.01~0.05g的表面活性剂Tween20,调节pH至6~8;样品垫可选用玻璃纤维或聚酯材料,30cm长样品垫置于上述缓冲液、表面活性剂和蛋白的混合溶液2~5mL中浸泡2~4小时,取出后20~25℃干燥8~12小时可得,其中,PBS缓冲液也可用Tris或甘氨酸缓冲液代替,BSA蛋白也可用酪蛋白代替,表面活性剂Tween20也可用Triton X100代替;

[0045] 2.2结合垫3的制备:先利用上述样品垫同样的方法处理结合垫,再将实施例一制备的双重放大荧光微球用PBS缓冲液(10mM,pH7.4,含2%BSA和2%蔗糖)稀释3000倍,均匀的涂布在结合垫,置于20~25℃干燥4~8小时;

[0046] 2.3硝酸纤维素膜4的处理:

[0047] A.检测线6的制备:将cTnI相应的捕获单克隆抗体或多克隆抗体用20mmol/L,pH7.2的PB缓冲液稀释到2.0mg/mL的浓度,0.8μL/cm在硝酸纤维素膜上划线涂布得检测线,干燥箱内20~25℃鼓风干燥8~12h;

[0048] B.质控线7的制备:兔抗鼠IgG抗体按4mg/mL的浓度,0.8μL/cm在硝酸纤维素膜上划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔5mm,干燥箱内20~25℃鼓风干燥8~12h;

[0049] 2.4吸水垫5的制备:吸水纸裁剪成30*2.7cm每条;

[0050] 2.5组装:塑料底板1,样品垫2和吸水垫5为本领域通用的部件,将上述硝酸纤维素膜4、吸水垫5、样品垫3粘贴在塑料底板1上,将贴好的中间物用斩切机切成一定宽度的试剂条,20~25℃鼓风干燥8~12h即得所述的荧光免疫试剂条。

[0051] 实施例三:荧光免疫层析诊断试剂检测

[0052] 3.1传统聚苯乙烯标记荧光层析试剂和本发明试剂检测性能对比

[0053] 样品垫上加入不同浓度的cTnI抗原标准品(取10个不同浓度,分别为0,0.01,0.02,0.04,0.08,0.16,0.32,0.64,1.28,2.56,5.12ng/mL,每个样本浓度设定三次重复)分别滴加120μL于两试剂条加样孔中,15min后通过基蛋生物科技股份有限公司的荧光免疫定量分析仪Getein1100读取信号,实验结果见图3:

[0054] 如图3所示,传统聚苯乙烯荧光微球体系的检测范围下限为0.08ng/mL。利用本发明所述的双增强荧光微球后,检测范围下限为0.01ng/mL,与传统的胶体金和聚苯乙烯微球相比,检测下限更低,荧光强度有了10~20倍以上的提高。这一结果证实了本发明体系实现了荧光免疫标记放大增强性能,大幅提高了灵敏度。

[0055] 3.2本发明试剂条相关性评估

[0056] 取多份血清标本分别用罗氏相关产品和本发明体系试剂条测试cTnI含量后,挑选

出其中梯度合适的15份,作图比较相关性由图4可见。体系表现出良好地相关性, R^2 值高达0.9992,证实了本发明体系以及依据该体系的试剂盒除了具有超高灵敏度,更宽的检测范围外,还有极佳的准确性。

[0057] 3.3本发明试纸条时间衍变性评估

[0058] 配制浓度为1.00ng/mL的检测样本,分别滴加120 μ L于本发明试剂条加样孔中,分别于1min,3min,5min,10min,20min和30min使用GT1100系列荧光免疫定量分析仪重复测定,比较不同时间检测结果的差异,计算相对偏差(以3min为基准),结果如表1所示。结果显示在3~30min内样本检测浓度差异性均较小,时间衍变性 $<5\%$ 。证实了本发明体系以及依据该体系的试剂盒检测时间衍变性小,更好体现测量准确性。

[0059] 表1试剂条的不同时间衍变性

[0060]

时间	3min	5min	8min	10min	20min	30min
浓度	0.98	0.99	0.98	0.10	0.10	0.99
相对偏差	0	1.02%	0%	2.04%	2.04%	1.02%

[0061] 3.4本发明试剂条重复性评估

[0062] 配制1.0ng/mL和0.2ng/mL的cTnI标准品溶液,采用本发明体系试剂条进行测定浓度,分别重复测定10次,分别计算测定均值和标准偏差、CV值如表2。进行重复性考察,结果显示两种浓度重复性分别为9.7%、9.3%,完全能够满足临床要求。

[0063] 表2试剂条重复性

[0064]

序号	标准值1.00ng/mL	标准值0.20ng/mL
1	0.893	0.178
2	1.218	0.234
3	1.110	0.204
4	0.980	0.210
5	0.974	0.207
6	1.020	0.184
7	1.010	0.189
8	0.925	0.176
9	0.905	0.219
10	1.115	0.224
平均值	1.015	0.203
标准偏差	0.099	0.019
CV	9.70%	9.30%

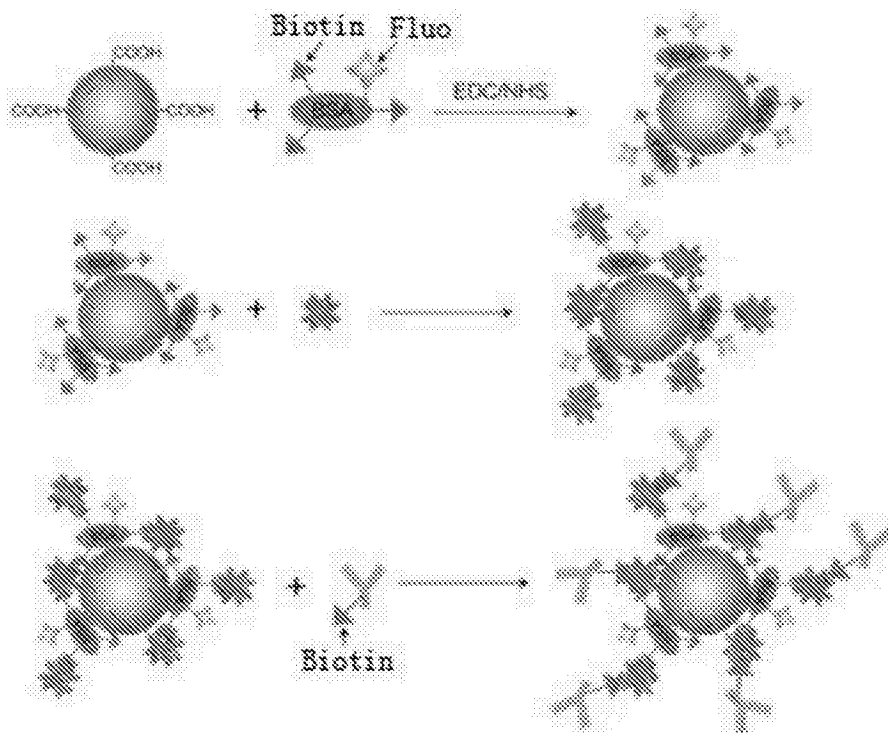


图1

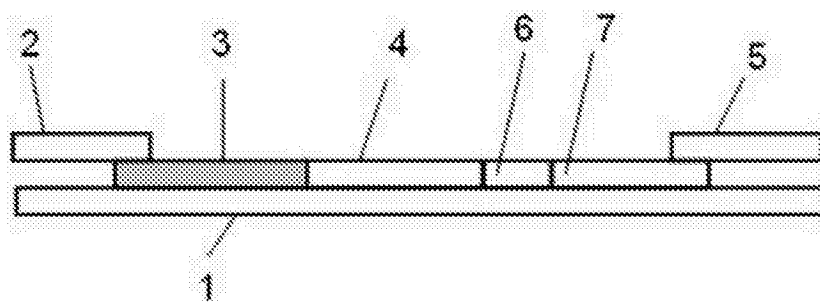


图2

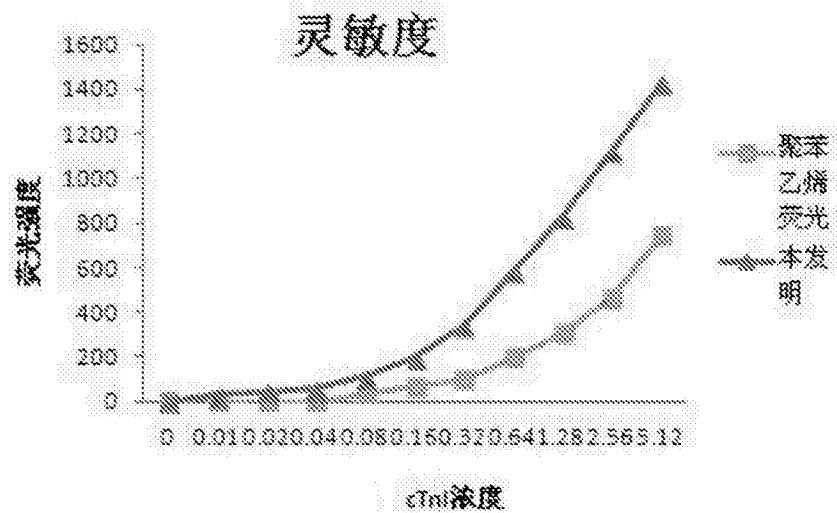


图3

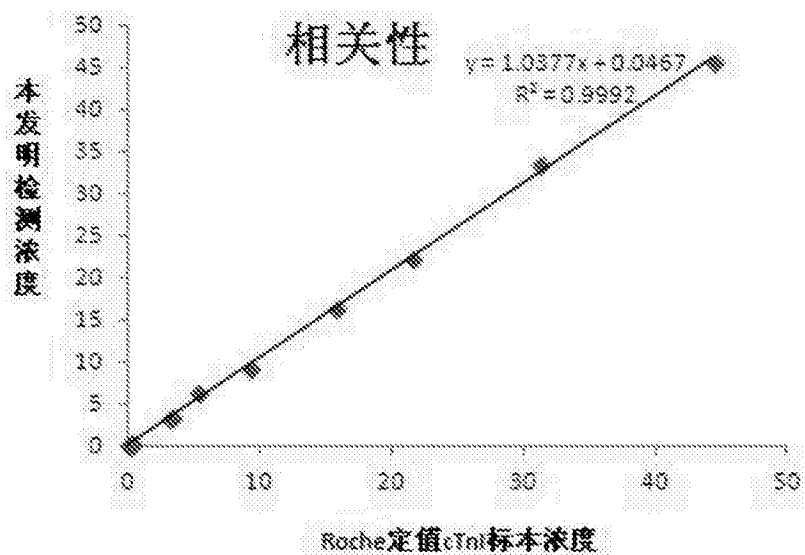


图4

专利名称(译)	双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法		
公开(公告)号	CN105738616A	公开(公告)日	2016-07-06
申请号	CN201610072237.X	申请日	2016-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
[标]发明人	金晶 黄力 杜腾飞 罗雅赛 苏恩本		
发明人	金晶 黄力 杜腾飞 罗雅赛 苏恩本		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	陈书华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种双重放大荧光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备荧光免疫层析试剂条的方法，属于荧光免疫层析体外诊断中的荧光标记领域。该双重放大荧光免疫标记探针的制备方法包括如下步骤：步骤一：生物素化待测物质探测分子和生物素化载体的制备；步骤二：修饰生物素和小分子荧光染料的荧光微球的制备；步骤三：双重放大荧光免疫标记探针的制备。本发明双重放大荧光免疫标记探针，将增强荧光强度和增加荧光微球的探测分子结合量两种方式有效结合，利用生物素亲合素间结合作用实现一次放大，同时利用载体在荧光微球外添加荧光强度实现另一次放大，双重放大模式极大的提升了荧光免疫分析荧光信号强度。

