



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593913 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810393383.1

G01N 27/62(2006.01)

(22)申请日 2018.04.27

G01N 27/64(2006.01)

(71)申请人 天津华科泰生物技术有限公司

地址 300000 天津市北辰区天津北辰经济
技术开发区医药园京福公路东侧优谷
新科园135-1,4-401;135-1,4-402

(72)发明人 林斯

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限
公司 11228

代理人 张秋越

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

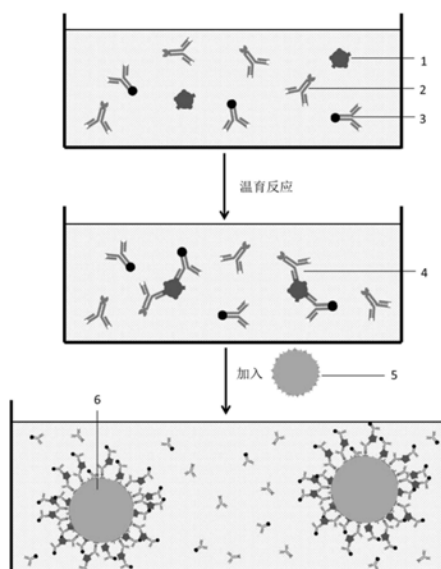
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲
检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法,通过采用电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术实现了双脉冲信号检测方法,通过采用金属纳米颗粒标记免疫反应,进一步利用电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术检测标记免疫反应的金属离子的脉冲信号,从而实现间接检测待测物的目的。



1. 一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将含有待测物的样本、具有特异亲和性一对物质中的一个标记的待测物的一株抗体和小纳米颗粒标记的待测物的另一株抗体加入到反应池中,孵育1-120min,形成一端标记有小纳米颗粒、另一端标记有具有特异亲和性一对物质中的一个的免疫复合物;

2) 然后向步骤1) 反应后的混合物中加入具有特异亲和性的一对物质中的另一个标记的大纳米微球,标记在步骤1) 中免疫复合物一端的具有特异亲和性的一对物质中的一个与标记在大纳米微球表面的具有特异性亲和性一对物质中的另一个进行特异性结合,形成大纳米微球外表面结合了大量的步骤1) 中的免疫复合物;

3) 最后将步骤2) 中反应后的混合物直接加入到配套仪器中,大纳米微球中的特征金属元素、大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中的特征金属元素以及未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中的特征金属元素会同时产生强脉冲强度信号,配套仪器中的检测器同时捕获两种金属元素的脉冲信号,采用双脉冲信号同步分析手段,通过大纳米微球中特征金属元素的脉冲信号来识别小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号,并进一步滤除未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲强度信号来获得大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号;大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中特征金属元素脉冲信号的数量与待测物的含量具有正相关性,通过待测物的标准曲线的计算能够获得样本中待测物的含量。

2. 如权利要求1所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述配套仪器为微波等离子体炬质谱仪或电感耦合等离子体质谱仪。

3. 如权利要求1所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述大纳米微球或小纳米颗粒的材质包含碱金属、碱土金属、镧系金属、铜系金属、过渡金属、主族金属或类金属但不限于上述金属微球,或者为上述金属化合物的纳米颗粒,或者为上述金属材料与二氧化硅或聚合物形成的核/壳结构或者掺杂结构的微球,或者为上述金属化合物与二氧化硅或聚合物形成的核/壳结构或者掺杂结构的微球;并且大纳米微球的粒径100nm~100 μ m,小纳米颗粒的粒径为0.1nm~800nm。

4. 如权利要求3所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述碱金属为锂Li、钠Na、钾K、铷Rb、铯Se或钫Fr;所述碱土金属为铍Be、镁Mg、钙Ca、锶Sr、钡Ba或镭Ra;所述镧系金属为镧La、铈Ce、镨Pr、钕Nd、钷Pm、钐Sm、铕Eu、钆Gd、铽Tb、镝Dy、钬Ho、铒Er、铥Tm、镱Yb或镥Lu;所述铜系金属为铜Ac、钍Th、镤Pa、铀U、镎Np、钚Pu、镅Am、镅Cm、镅Bk、镅Cf、镅Es、镅Fm、钷Md、镱No或镱Lr;所述过渡金属为钪Sc、钛Ti、钒V、铬Cr、锰Mn、铁Fe、钴Co、镍Ni、铜Cu、锌Zn、钇Y、锆Zr、铌Nb、钼Mo、锝Tc、钌Ru、铑Rh、钯Pd、银Ag、镉Cd、铪Hf、钽Ta、钨W、铼Re、铱Os、铱Ir、铂Pt、金Au或汞Hg;所述主族金属为铝Al、镓Ga、铟In、锡Sn、铊Tl、铅Pb、铋Bi、Uut、Uuq、Uup或Uuh;所述类金属为硼B、硅Si、锗Ge、砷As、锑Sb、碲Te或钋Po。

5. 如权利要求1所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述大纳米微球和小纳米颗粒中的金属元素不同时为同一种金属;且所述大纳米微球粒径要大于小纳米颗粒。

6. 如权利要求1所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述具有特异亲和性的一对物质为生物素和链酶亲和素、生物素和亲和素、荧光素和抗荧光素、抗体和特异性结合此抗体的二抗;

并且所述具有特异亲和性的一对物质与大纳米微球、待测物的一株抗体之间的连接方

式为化学偶联或者为物理吸附；小纳米颗粒与待测物的另一株抗体连接方式为化学偶联或者物理吸附。

7. 如权利要求1所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述待测物的一株抗体通过化学偶联或者物理吸附的方式直接连接到大纳米微球的表面上,不通过具有特异亲和性的一对物质进行连接;

所述小纳米颗粒与待测物的另一株抗体之间通过具有特异亲和性的一对物质的桥梁作用进行连接,具有特异亲和性的一对物质中的一个与小纳米颗粒之间连接方式为化学偶联或者物理吸附,具有特异亲和性的一对物质中的另一个与待测物的抗体之间的连接方式为化学偶联或者为物理吸附。

8. 如权利要求1-7任一项所述的免疫反应双脉冲检测方法,其特征在于,所述的免疫反应为均相或非均相。

一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,但不限制于此领域,具体涉及一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法。

背景技术

[0002] 目前,在免疫诊断方面,临床上常用的有放射免疫法、酶联免疫法、化学发光法、电化学发光法;同时在快速检验领域,常用的有胶体金法、荧光免疫层析法以及新兴的微流控芯片检测方式等。然而,放射免疫法存在放射污染,对人体损害大;酶联免疫法和化学发光法的操作繁琐、检测周期长;电化学法检测系统配套使用的电极设备以及精密的信号解析系统,检测设备昂贵;胶体金法、荧光免疫层析法批间变异大、标记物的稳定性差;微流控芯片法目前尚未实现商业化应用。

[0003] 质谱分析是一种测量离子质荷比(质量-电荷比)的分析方法,其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离,生成不同荷质比的带电荷的离子,经加速电场的作用,形成离子束,进入质量分析器。在质量分析器中,再利用电场和磁场使发生相反的速度色散,将它们分别聚焦而得到质谱图,从而确定其质量。

[0004] 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)是20世纪80年代发展起来的无机元素和同位素分析测试技术,它以独特的接口技术将电感耦合等离子体的高温电离特性与质谱计的灵敏快速扫描的优点相结合而形成一种高灵敏度的分析技术。ICP-MS仪器所使用的等离子体除了方位和线圈接地方式外,与发射光谱中使用的基本相同。所使用的质量分析器、离子检测器和数据采集系统又与四极杆GC-MS仪器相类似。质量分析器多采用四极杆质谱计,也有采用具有高分辨的双聚焦扇形磁场质谱计、飞行时间质谱计等。该技术的特点:灵敏度高;速度快,可在几分钟内完成几十个元素的定量测定;谱线简单,干扰相对于光谱技术要少;线性范围可达7~9个数量级;样品的制备和引入相对于其他质谱技术简单;既可用于元素分析,还可进行同位素组成的快速测定;测定精密度(RSD)可到0.1%。

[0005] 微波等离子体炬是金钦汉等提出并研制的一种新型等离子体发生装置。微波等离子体炬质谱(MPT-MS)包括微波功率源、雾化去溶装置、微波等离子炬和离子质量分析装置。样品溶液由蠕动泵泵入雾化去溶装置进行雾化去溶,产生的干燥气溶胶由矩管的中心通道进入炬焰,在微波功率源的作用下电离,产生可供质谱仪分析的离子。其具有功率低、耗气省、易于医学检测推广应用的特点。

[0006] ICP-MS与MPT-MS质谱分析技术具有动态线性范围宽、检测限低、灵敏度高、测量精度高的优点,被广泛应用于生物、医药、环境、食品等领域。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的是提供一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法。

[0008] 为了实现本发明的目的,本发明提供一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检

测方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 将含有待测物的样本、具有特异亲和性一对物质中的一个标记的待测物的一株抗体和小纳米颗粒标记的待测物的另一株抗体加入到反应池中,孵育1-120min,形成一端标记有小纳米颗粒、另一端标记有具有特异亲和性一对物质中的一个的免疫复合物;

[0010] 2) 然后向步骤1) 反应后的混合物中加入具有特异亲和性的一对物质中的另一个标记的大纳米微球,标记在步骤1) 中免疫复合物一端的具有特异亲和性的一对物质中的一个与标记在大纳米微球表面的具有特异性亲和性一对物质中的另一个进行特异性结合,形成大纳米微球外表面结合了大量的步骤1) 中的免疫复合物;

[0011] 3) 最后将步骤2) 中反应后的混合物直接加入到配套仪器中,大纳米微球中的特征金属元素、大纳米微球表面结合的免疫复合物上小纳米颗粒中的特征金属元素以及未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中的特征金属元素会同时产生强脉冲强度信号,配套仪器中的检测器同时捕获两种金属元素的信号,采用双脉冲信号同步分析手段,通过大纳米微球中特征金属元素的脉冲信号来识别小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号,并进一步滤除未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲强度信号来获得大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号;大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中特征金属元素脉冲信号的数量与待测物的含量具有正相关性,通过待测物的标准曲线的计算能够获得待测物的含量。

[0012] 进一步地,其中所述配套仪器为微波等离子体炬质谱仪或电感耦合等离子体质谱仪。

[0013] 进一步地,其中所述大纳米微球或小纳米颗粒的材质包含碱金属、碱土金属、镧系金属、铜系金属、过渡金属、主族金属或类金属但不限于上述金属微球,或者为上述金属化合物的纳米颗粒,或者为上述金属材料与二氧化硅或聚合物形成的核/壳结构或者掺杂结构的微球,或者为上述金属化合物与二氧化硅或聚合物形成的核/壳结构或者掺杂结构的微球;并且大纳米微球的粒径100nm~100 μ m,小纳米颗粒的粒径为0.1nm~800nm。

[0014] 进一步地,其中所述碱金属为锂Li、钠Na、钾K、铷Rb、铯Se或钫Fr;所述碱土金属为铍Be、镁Mg、钙Ca、锶Sr、钡Ba或镭Ra;所述镧系金属为镧La、铈Ce、镨Pr、钕Nd、钷Pm、钐Sm、铕Eu、钆Gd、铽Tb、镝Dy、钬Ho、铒Er、铥Tm、镱Yb或镥Lu;所述铜系金属为铜Ac、钍Th、镤Pa、铀U、镎Np、钚Pu、镅Am、锔Cm、锫Bk、锇Cf、锿Es、镆Fm、钷Md、锆No或镱Lr;所述过渡金属为钪Sc、钛Ti、钒V、铬Cr、锰Mn、铁Fe、钴Co、镍Ni、铜Cu、锌Zn、钇Y、锆Zr、铌Nb、钼Mo、锝Tc、钌Ru、铑Rh、钯Pd、银Ag、镉Cd、铪Hf、钽Ta、钨W、铼Re、锇Os、铱Ir、铂Pt、金Au或汞Hg;所述主族金属为铝Al、镓Ga、铟In、锡Sn、铊Tl、铅Pb、铋Bi、Uut、Uuq、Uup或Uuh;所述类金属为硼B、硅Si、锗Ge、砷As、锑Sb、碲Te或钋Po。

[0015] 进一步地,其中所述大纳米微球和小纳米颗粒中的金属元素不同时为同一种金属;且所述大纳米微球粒径要大于小纳米颗粒。

[0016] 进一步地,其中所述具有特异亲和性的一对物质为生物素和链酶亲和素、生物素和亲和素、荧光素和抗荧光素、抗体和特异性结合此抗体的二抗;

[0017] 并且所述具有特异亲和性的一对物质与大纳米微球、待测物的一株抗体之间的连接方式为化学偶联或者为物理吸附;小纳米颗粒与待测物的另一株抗体连接方式为化学偶联或者物理吸附。

[0018] 进一步地,其中所述待测物的一株抗体通过化学偶联或者物理吸附的方式直接连接到大纳米微球的表面上,不通过具有特异亲和性的一对物质进行连接;

[0019] 所述小纳米颗粒与待测物的另一株抗体之间通过具有特异亲和性的一对物质的桥梁作用进行连接,具有特异亲和性的一对物质中的一个与小纳米颗粒之间连接方式为化学偶联或者物理吸附,具有特异亲和性的一对物质中的另一个与待测物的抗体之间的连接方式为化学偶联或者为物理吸附。

[0020] 进一步地,其中所述的免疫反应为均相或非均相。

[0021] 本发明立足于均相/非均相反应,联用质谱采集金属纳米颗粒的脉冲信号,将脉冲信号转换成待测物的含量,检测速度快,检测结果稳定、准确、可靠。

[0022] 本发明具有以下有益效果:

[0023] 1、本发明通过采用电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术实现了双脉冲信号检测方法,通过采用金属纳米颗粒标记免疫反应,进一步利用电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术检测标记免疫反应的金属离子的脉冲信号,从而实现间接检测待测物的目的;

[0024] 2、本发明采用的电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术具有检测的线性范围宽、检测线低检测速度快、灵敏度高、测量精度高等优点,拓展了电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术在医学检验领域中的应用;

[0025] 3、本发明采用双脉冲信号同步分析手段,通过大纳米微球中特征金属元素的脉冲信号来识别小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号,并且进一步滤除未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲强度信号来获得大纳米微球表面结合的免疫复合物上的小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号,省去了洗涤过程,提升信噪比,提高系统检测灵敏度。

附图说明

[0026] 图1是本发明所述的基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法示意图,其中,1-待测物,2-具有特异亲和性的一对物质中的一个标记的待测物的一株抗体,3-小纳米颗粒标记的待测物的另一株抗体,4-一端标记有小纳米颗粒、另一端标记有具有亲和性的一对物质中的一个的免疫复合物,5-具有特异亲和性的一对物质中的另一个标记的大纳米微球,6-大纳米微球外表面结合了大量的步骤1)中的免疫复合物;

[0027] 图2是将步骤2)反应后的混合物直接进行检测获得的AFP的标准曲线。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例解释本发明,实施案例仅用于说明本发明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0029] 如图1所示,本发明提供了一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法,包括以下步骤:

[0030] 1) 将含有待测物1的样本、具有特异亲和性一对物质中的一个标记的待测物的一株抗体2和小纳米颗粒标记的待测物的另一株抗体3加入到反应池中, 孵育5-60min, 形成一端标记有小纳米颗粒、另一端标记有具有亲和性一对物质中的一个的免疫复合物4;

[0031] 2) 然后向步骤1) 反应后的混合物中加入具有特异亲和性的一对物质中的另一个标记的大纳米微球5, 标记在步骤1) 中免疫复合物一端的具有特异亲和性的一对物质中的一个与标记在大纳米微球表面的具有特异性亲和性一对物质中的另一个进行特异性结合, 形成大纳米微球外表面结合了大量的步骤1) 中的免疫复合物6;

[0032] 3) 最后将步骤2) 中反应后的混合物直接加入到配套仪器中, 大纳米微球中的特征金属元素、大纳米微球表面结合的免疫复合物上小纳米颗粒中的特征金属元素以及未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中的特征金属元素会同时产生强脉冲强度信号, 配套仪器中的检测器同时捕获两种金属元素的脉冲信号, 采用双脉冲信号同步分析手段, 通过大纳米微球中特征金属元素的脉冲信号来识别小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号, 并进一步滤除未参加反应的另一株抗体上的小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲强度信号来获得大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中特征金属元素的脉冲信号; 大纳米微球表面结合的大量免疫复合物上小纳米颗粒中特征金属元素脉冲信号的数量与待测物的含量具有正相关性, 通过待测物的标准曲线的计算能够获得待测物的含量。

[0033] 其中所述配套仪器为微波等离子体炬质谱仪或电感耦合等离子体质谱仪。

[0034] 其中所述大纳米微球的材质为碱金属(锂Li、钠Na、钾K、铷Rb、铯Se、钫Fr)、碱土金属(铍Be、镁Mg、钙Ca、锶Sr、钡Ba、镭Ra)、镧系金属(镧La、铈Ce、镨Pr、钕Nd、钷Pm、钐Sm、铕Eu、钆Gd、铽Tb、镝Dy、钬Ho、铒Er、铥Tm、镱Yb、镱Lu)、锕系金属(锕Ac、钍Th、镤Pa、铀U、镎Np、钚Pu、镅Am、锔Cm、锫Bk、锇Cf、锿Es、镆Fm、钷Md、锆No、镱Lr)、过渡金属(钪Sc、钛Ti、钒V、铬Cr、锰Mn、铁Fe、钴Co、镍Ni、铜Cu、锌Zn、钇Y、锆Zr、铌Nb、钼Mo、锝Tc、钌Ru、铑Rh、钯Pd、银Ag、镉Cd、铪Hf、钽Ta、钨W、铼Re、锇Os、铱Ir、铂Pt、金Au、汞Hg)、主族金属(铝Al、镓Ga、铟In、锡Sn、铊Tl、铅Pb、铋Bi、Uut、Uuq、Uup、Uuh)、类金属(硼B、硅Si、锗Ge、砷As、锑Sb、碲Te、钋Po) 等包含但不限于上述金属微球, 或者为上述金属化合物的纳米颗粒, 或者为上述金属材料与二氧化硅或聚合物形成的核/壳结构或者掺杂结构的微球, 或者为上述金属化合物与二氧化硅或聚合物形成的核/壳结构或者掺杂结构的微球; 并且大纳米微球的粒径100nm~100 μ m, 小纳米颗粒的粒径为0.1~800nm。

[0035] 其中所述大纳米微球和小纳米颗粒中的金属元素不同时为同一种金属; 且所述大纳米微球粒径要大于小纳米颗粒。

[0036] 其中所述具有特异亲和性的一对物质为生物素和链酶亲和素、生物素和亲和素、荧光素和抗荧光素、抗体和特异性结合此抗体的二抗;

[0037] 并且所述具有特异亲和性的一对物质与大纳米微球、待测物的一株抗体之间的连接方式为化学偶联或者为物理吸附; 小纳米颗粒与待测物的另一株抗体连接方式为化学偶联或者物理吸附。

[0038] 其中所述待测物的一株抗体通过化学偶联或者物理吸附的方式直接连接到大纳米微球的表面上;

[0039] 所述小纳米颗粒与待测物的另一株抗体之间通过具有特异亲和性的一对物质的桥梁作用进行连接, 具有特异亲和性的一对物质中的一个与小纳米颗粒之间连接方式为化

学偶联或者物理吸附,具有特异亲和性的一对物质中的另一个与待测物的抗体之间的连接方式为化学偶联或者为物理吸附。

[0040] 其中所述的免疫反应为均相或非均相。

[0041] 以下通过具体实施例对本发明进行进一步的说明。

[0042] 实施例1(双脉冲夹心法)

[0043] 1.Pt纳米颗粒的制备:

[0044] 依次将0.15g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、33.9mg氯铂酸($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、20mL超纯水、20mL乙二醇加入到反应容器中,在剧烈搅拌下,在60℃下回流反应3h,得到棕黑色的Pt纳米颗粒胶体溶液。

[0045] 2.链酶亲和素标记金纳米颗粒:

[0046] 取0.5mL,2.5mg/mL金(Au)微球(150nm,西安凯新生物科技有限公司)用PBS缓冲溶液中(pH=7.4)洗涤2次后重悬与10mL的PBS缓冲溶液中;向洗涤后的金微球溶液中继续加入5mg EDC和5mg NHS,搅拌下活化1h;用PBS缓冲溶液洗涤后重悬于10mL PBS缓冲溶液中,继续加入封闭液封闭30min,用PBS缓冲溶液洗涤后重悬于10mL PBS缓冲溶液中待用。

[0047] 3.生物素标记一株鼠抗人甲胎蛋白(AFP)单克隆抗体:

[0048] 先用碳酸钠缓冲液将一株鼠抗人AFP单克隆抗体稀释成1mg/mL,并用碳酸钠缓冲液室温(25℃±5℃)避光搅拌4小时后透析;随后用N,N-二甲基酰胺(DMF)将6-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺-生物素(BCNHS)配置成1mg/mL;在1mL一株鼠抗人AFP单克隆抗体溶液中加入上述DMF溶液125μL~66.7μL,玻璃瓶中混合,室温(25℃±5℃)避光搅拌2小时;加入1mol/L氯化铵溶液9.6μL,室温(25℃±5℃)避光搅拌10分钟;然后混合溶液转入透析袋,用磷酸缓冲液4℃透析过夜。最后取出加等量甘油-20℃保存即可。

[0049] 4.Pt纳米颗粒标记另一株鼠抗人AFP单克隆抗体

[0050] 先用碳酸钠缓冲液将另一株鼠抗人AFP单克隆抗体稀释成1mg/mL,并用碳酸钠缓冲液室温(25℃±5℃)避光搅拌4小时后透析;在5mL制备的Pt纳米颗粒胶体溶液中加入1mL另一株鼠抗人AFP单克隆抗体溶液,在25℃±5℃下避光磁力搅拌30min,然后混合溶液转入透析袋,用磷酸缓冲液4℃透析过夜。最后取出加等量甘油-20℃保存即可。

[0051] 5.检测过程:

[0052] (1)将10μL待测样本、10μL生物素标记的一株鼠抗人AFP单克隆抗体和10μL Pt纳米颗粒标记的另一株鼠抗人AFP单克隆抗体加入到反应池中,在37℃下温育反应30min,形成一端标记有Pt纳米颗粒、另一端标记有生物素的AFP免疫复合物;

[0053] (2)继续向步骤1)反应后的混合物中加入链酶亲和素标记的金微球,标记在AFP免疫复合物一端的生物素与标记在金微球表面的链酶亲和素发生特异性结合,形成金微球表面结合了大量的标记有Pt纳米颗粒的AFP免疫复合物;

[0054] (3)将步骤(2)中反应后的混合物使用ICP-MS检测,ICP-MS中的检测器同时捕获Au微球、金微球表面结合的AFP免疫复合物上的Pt纳米颗粒的脉冲信号以及未参加反应的另一株鼠抗人AFP单克隆抗体上Pt纳米颗粒的脉冲信号,采用双脉冲信号同步分析手段,通过Au微球的脉冲信号识别Pt纳米颗粒的脉冲信号,并且进一步滤除未参加反应的另一株鼠抗人AFP单克隆抗体上Pt纳米颗粒的脉冲信号来获得Au微球表面结合的AFP免疫复合物上的Pt纳米颗粒的脉冲信号,Au微球表面结合的AFP免疫复合物上的Pt纳米颗粒脉冲信号的数

量与样本中APF的含量具有正相关性,通过AFP标准曲线计算能够得到样本中APF的含量。

[0055] 6.标准曲线的建立

[0056] 配置浓度为0、5、10、50、150、600ng/mL的AFP校准品用于建立AFP标准曲线,检测灵敏度为5ng/mL,检测范围为5~600ng/mL,检测结果如表1所示,标准曲线如图2所示。

[0057] 表1

[0058]

AFP校准品 (ng/mL)	0	5	10	50	150	600
Pt脉冲信号数量 (cps)	1451	14256	30219	168764	429183	1923586

[0059] (1) PBS缓冲溶液

磷酸二氢钠 0.24 g

磷酸氢二钠 1.44 g

[0060] 氯化钠 8.0 g

氯化钾 0.2 g

纯化水定容至 1000 mL;

[0061] (2) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (LM)

柠檬酸三钠 7.33 g

柠檬酸 4.44 g

[0062]

氢氧化钠 1 g

纯化水定容至 1000 mL;

[0063] (3) 封闭液

牛血清白蛋白 50 g

蔗糖 50 g

磷酸二氢钠 0.99 g

[0064]

磷酸氢二钠 5.16 g

Proclin300 1 mL

纯化水定容至 1000 mL;

[0065] (4) 碳酸钠缓冲液 (CB)

[0066] 碳酸钠 4.33g

[0067] 碳酸氢钠 2.96g

[0068] 纯化水定容至 1000mL;

[0069] (5) 磷酸缓冲溶液 (PB)

[0070] 磷酸二氢钠 0.99g

[0071] 磷酸氢二钠 5.16g

[0072] 纯化水定容至 1000mL。

[0073] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在

本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

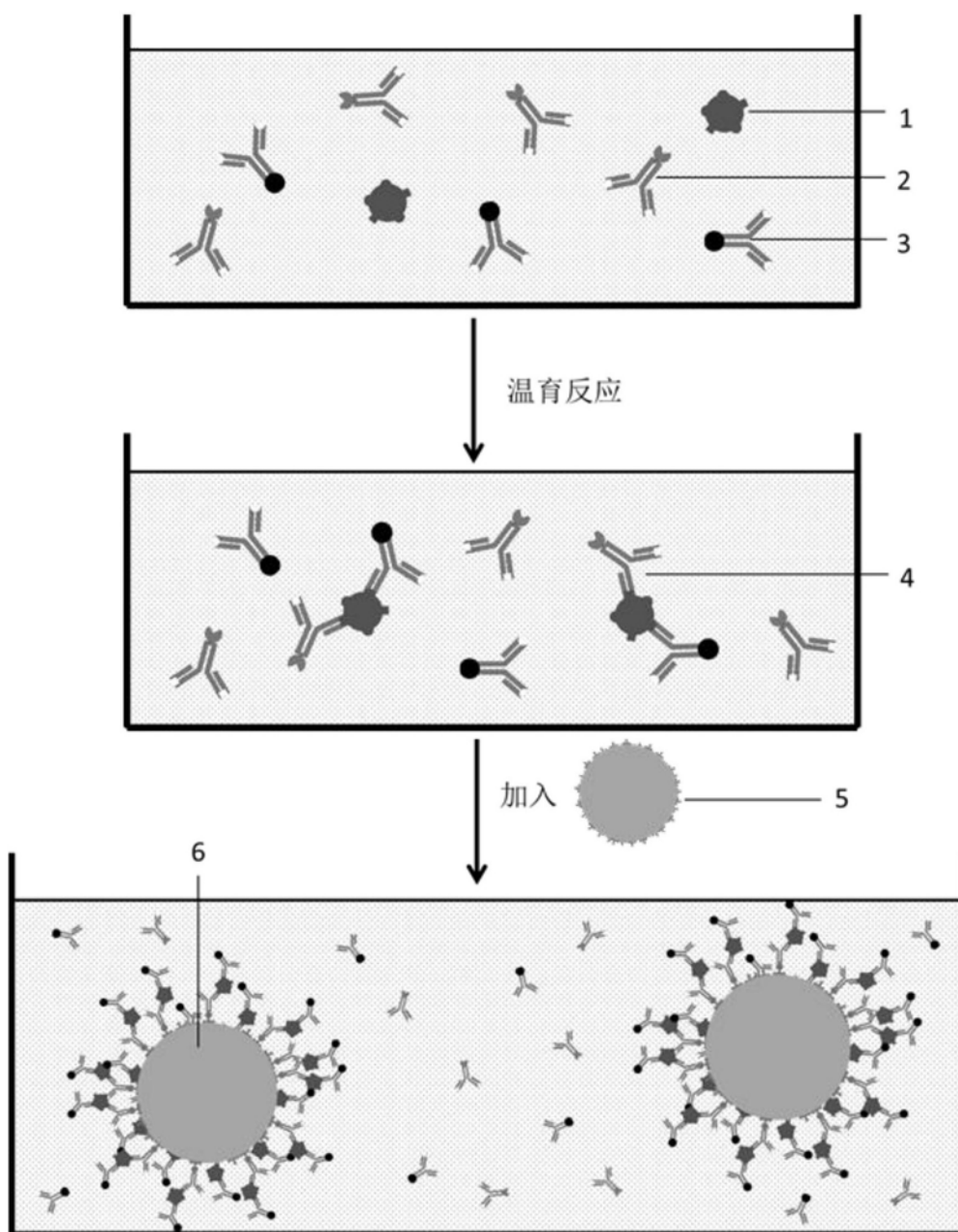


图1

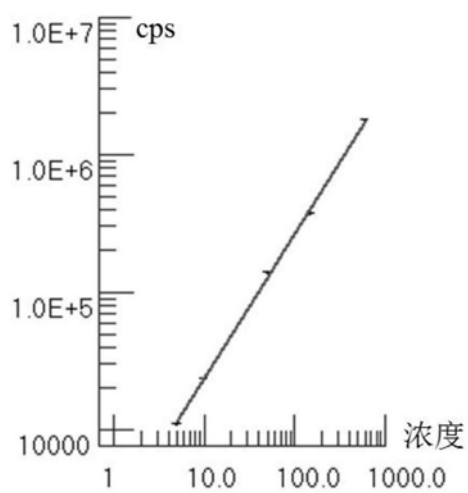


图2

专利名称(译)	一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法		
公开(公告)号	CN108593913A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201810393383.1	申请日	2018-04-27
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68 G01N27/62 G01N27/64		
CPC分类号	G01N27/626 G01N27/64 G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2333/4728 G01N2560/00		
代理人(译)	张秋越		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于质谱分析技术的免疫反应双脉冲检测方法，通过采用电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术实现了双脉冲信号检测方法，通过采用金属纳米颗粒标记免疫反应，进一步利用电感耦合等离子体或微波等离子体质谱分析技术检测标记免疫反应的金属离子的脉冲信号，从而实现间接检测待测物的目的。

