



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613255 A

(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201811392775.2

(22)申请日 2018.11.21

(71)申请人 北京利德曼生化股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
兴海路5号

(72)发明人 郭健夫 桂颖 王义君

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务
所(普通合伙) 11598

代理人 余光军

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

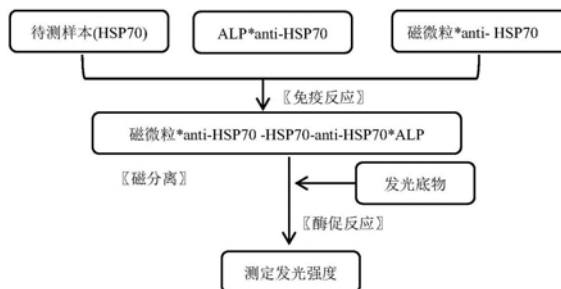
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

用于检测热休克蛋白70(HSP70)的磁微粒分离化学发光免疫测定法

(57)摘要

本发明公开了一种人体热休克蛋白70(HSP70)磁微粒分离化学发光免疫检测方法,试剂盒组成包括:校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液,其中,校准品为含一系列浓度的热休克蛋白70(HSP70)抗原,用于建立标准曲线;质控品为含一定浓度热休克蛋白70(HSP70)抗原的缓冲液配制而成;试剂A为含一定浓度磁微粒标记的热休克蛋白70(HSP70)抗体溶液;试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的热休克蛋白70(HSP70)抗体溶液;清洗液浓缩液用于配制清洗液;发光底物液为碱性磷酸酶(ALP)催化的发光底物溶液。本发明极大地提高了免疫反应的信号强度和灵敏度,使低含量物质在进行免疫结合时也能产生很强的化学发光信号,为人体热休克蛋白70(HSP70)的检测提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。



1. 人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 试剂盒组成包括: 校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液, 其中, 校准品为含一系列浓度的热休克蛋白70 (HSP70) 抗原, 用于建立标准曲线; 质控品为含一定浓度热休克蛋白70 (HSP70) 抗原的缓冲液配制而成; 试剂A为含一定浓度磁微粒标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体溶液; 试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体溶液; 清洗液浓缩液用于配制清洗液; 发光底物液为碱性磷酸酶 (ALP) 催化的发光底物溶液; 检测方法包括:

(1) 免疫反应: 将待测样品与质控品、50 μ l 试剂A、50 μ l 试剂B依次加入反应管中, 37 $^{\circ}$ C 条件下混合温育15min;

(2) 磁分离: 使磁微粒在磁场中沉降, 去上清, 加入200–500 μ l 清洗液, 去除磁场, 然后再次使磁微粒在磁场中沉降, 去除上清液; 如此重复2–4次, 以去除未结合的抗体和杂质;

(3) 读值: 加入发光底物液150 μ l, 碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

(4) 算出含量: 将待测样本的发光强度与校准品的标准曲线比对, 使用四参数Logistic 方程拟合可计算出待测样本中热休克蛋白70 (HSP70) 的含量。

2. 根据权利要求1所述人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述试剂A的配置方法包括: 将表面含有羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒进行磁分离, 然后用活化缓冲液清洗3次; 混悬后加入活化剂, 活化后的磁微粒溶液与热休克蛋白70 (HSP70) 抗体按比例混合, 使得热休克蛋白70 (HSP70) 抗体被共价偶联在磁微粒表面。

3. 根据权利要求2人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述活化缓冲液为摩尔浓度0.05M的 (2- (N-吗啡啉) 乙磺酸) MES, pH6.0, 所述活化剂为1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC)。

4. 根据权利要求2人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述比例为20:1。

5. 根据权利要求1人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述试剂B的配置方法包括: 热休克蛋白70 (HSP70) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 分别加入活化剂, 除盐; 活化后的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 按比例混合; 分离纯化, 除去未连接的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体和碱性磷酸酶 (ALP), 将连接物保存于4 $^{\circ}$ C。

6. 根据权利要求5人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 热休克蛋白70 (HSP70) 抗体加入的活化剂为2-Iminothiolane hydrochloride (2-IT), 碱性磷酸酶 (ALP) 加入的活化剂为Succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)。

7. 根据权利要求5人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述比例为1:1。

8. 根据权利要求5人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述除盐为使用Sephadex G25凝胶柱子除盐, 所述分离纯化为使用Superdex200凝胶层析柱分离纯化。

9. 根据权利要求1人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 建立标准曲线的方法包括:

(1) 免疫反应:将不同浓度的50 μ l的校准品分别与质控品、50 μ l试剂A、50 μ l试剂B依次加入反应管中,37 $^{\circ}$ C条件下混合温育15min;

(2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200-500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2-4次,以去除未结合的抗体和杂质;

(3) 读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

(4) 根据检测的数值使用四参数Logistic方程拟合,获得热休克蛋白70 (HSP70) 浓度-发光值标准曲线。

10. 根据权利要求9人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,校准品的系列浓度分别为0ng/ml,0.8ng/ml,2.5ng/ml,9.5ng/ml,25ng/ml,50ng/ml。

用于检测热休克蛋白70 (HSP70) 的磁微粒分离化学发光免疫测定法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,提供了用于检测热休克蛋白70 (HSP70) 的磁分离化学发光免疫测定法,适用于人血清热休克蛋白70 (HSP70) 定量检测。

背景技术

[0002] 各种生物有机体受到外界不利或有害因素刺激时,会发生一种生理性的快速、短暂细胞代谢调节,此期间细胞内一些正常基因的表达受到抑制,而一组特殊基因则被激活并表达增强,这一现象被称为热休克反应 (heatshockresponse, HSR), 这组特殊基因就是热休克基因,所产生的蛋白质称为热休克蛋白 (heatshockprotein HSP)。这类具有重要生理功能且具有高度保守性,普遍存在于整个生物界,在应激状态下可被导表达。1. Hsp70的概况

[0003] 1962年, Ritossa在果蝇的研究中首次发现,短暂的热休克可以诱导唾液腺染色体出现3个膨突,提示这一区带转录加强,他将这一现象称为“热休克反应 (HSR)”。1974年, Tissières等采用SDS-PAGE及放射性自显影技术,从热休克果蝇唾液腺细胞中分离出一组特殊蛋白质,并确定这种蛋白质的合成与染色体“膨松”有关,证实高温引起果蝇幼虫染色体蓬松是由于热休克激发基因转录以合成的特异蛋白引起。由于这种蛋白质是在热刺激下所产生,故称其为热休克蛋白 (HSP)。后来人们发现除高温外的其他刺激如缺血、缺氧、重金属、病毒感染、组织损伤等均可诱导HSP的合成,并关闭正常蛋白质的合成,故也有人称其为应激蛋白 (stressprotein, SP) 或热应激蛋白 (heatstressprotein, HSP)。10年后, Nover与Soger等先后阐明了编码HSP的序列、基因结构及其位点,并确定是由于高热影响到该基因中保守的上游调节序列即热休克元件 (heatshock element, HSE), 由此引起热休克应答, 转录合成HSP。

[0004] 2. Hsp70的分类

[0005] 根据其分子量及等电点不同将HSPs分成五大类 (或家族), 分别为: 低分子量HSPs家族、中等分子量HSPs家族、Hsp70家族、Hsp90家族和Hsp110家族。其中Hsp70是HSP家族中最保守、最主要、含量最丰富的一种, 具有多种功能, 是一种非特异性细胞保护蛋白, 也是近年来的研究备受关注的一类。人体细胞含有多个Hsp70家族成员, 包括应激诱导的Hsp70 (又称为Hsp72或Hsp70I)、结构型热休克蛋白Hsc70 (Hsp73)、线粒体Hsp75 (mtHsp75) 和位于内质网的Grp78 (BiP)。

[0006] Hsp70家族成员结构上的共性赋予其一些共同的生物学特性: (1) 所有的Hsp70都具有较高的ATP亲和性及氨基端具有弱的ATPase活性, 与肌肉的肌动蛋白结构很相似; (2) 当ATPase被激活时, 可与伸展的多态结合; (3) 保护各种酶免受热损伤, 使聚合的蛋白质解聚; (4) 可与各种未折叠或新合成的多肽链结合, 帮助其正确折叠, 协助它们的跨膜转运; (5) 发挥作用要靠其他HSP或细胞因子的辅助; (6) 具有高度保守钙调素结合结构域。

[0007] 3. Hsp70基因与蛋白质结构特点

[0008] Hsp70基因家族组成差异较大。如Hsc70基因含有8个内含子, 它的cDNA序列已在

人、大鼠、小鼠、中国仓鼠和牛等的细胞中被发现,据推测其所编码的蛋白质约含有646个氨基酸。Hsp70基因组成与Hsc70基因有很大不同,Hsp70及其部分相关基因在人类定位于6、14、21号等位染色体上。人类Hsp70基因由2440个核苷酸组成,其中5'端、3'端分别含有非编码的212与242个核苷酸序列,5'端上游是TATA盒,30个核苷酸处是热休克元件(HSE)。Hsp70基因没有内含子,转录一旦启动就可产生出成熟的mRNA来快速表达Hsp70,防止应激原对Hsp70mRNA前体的影响,从而保证了机体对Hsp70的需要。

[0009] 4.Hsp70的生物学功能

[0010] 4.1分子伴侣作用

[0011] 研究发现,蛋白质在折叠过程中需要一些辅助元件的参与,这些元件被称为分子伴侣,分子伴侣本身不参与蛋白质折叠的形成,而是通过结合和稳定蛋白质的不稳定构象,并通过有控制的结合和释放,促进新生多肽链的折叠、多聚体的装配或降解及细胞器蛋白的跨膜运输等。在应激状态下,HSPs可防止其他蛋白质发生变性或解聚,使之恢复活性,所以一般将HSPs称为分子伴侣。目前认为,Hsp70是最主要的分子伴侣之一,其在细胞内的分布最广、含量最丰富,主要参与细胞内蛋白质的从头合成和运输、蛋白质的折叠和蛋白质的降解及调节过程,以维持细胞蛋白的稳定性,提高细胞对应激原的耐受性,增强抗氧化作用,使细胞维持正常的生理功能。在多种应激情况下,受损蛋白质暴露疏水区,易被Hsp70底物识别区识别,利于清除受损蛋白,因而增加了受损细胞的存活能力。Hsp70N端和C端两个结构功能域对Hsp70的分子伴侣功能是至关重要的。

[0012] 4.2细胞保护作用

[0013] Hsp70的细胞保护作用是指机体细胞在受到各种应激如高热、氧化、机械损伤等刺激时,产生的Hsp70~以增强细胞对损害的抵抗能力以及加速异常蛋白质的降解,进而增强细胞内结构的稳定性,并维持其正常的生物学活性,提高细胞的生存率,从而起到细胞保护作用。

[0014] 4.3 Hsp70抗细胞凋亡作用

[0015] 细胞凋亡或称为程序性细胞死亡是受基因调控的一种主动性细胞自杀过程,它不仅是一种重要的生理现象,也是一种重要的病理现象,与多种疾病相关。经研究表明,Hsp70可以对细胞凋亡信号通路的多个水平调控,起到抑制细胞凋亡的作用。HSP的表达对热休克、氧化应激、电离射线、TNF- α 等多种刺激因素引起的细胞凋亡有抑制作用。

[0016] Hsp70抗细胞凋亡的机制可能有以下几种:(1)保护线粒体的功能;(2)抑制应激活化蛋白激酶;(3)抑制凋亡激活基因p53、Bax的表达;(4)抑制氧自由基的生成;(5)抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。

[0017] 4.4 Hsp70免疫功能

[0018] HSP是一种强有力的分子佐剂(亦称蛋白佐剂或免疫佐剂),在机体免疫反应中起着十分重要的作用。研究表明,Hsp70参与免疫反应和抑制炎症反应,Hsp70在受损细胞表面的表达可帮助免疫系统识别清除这些毒性细胞;Hsp70亦可协助抗原提呈细胞将抗原提呈给T细胞而参与细胞免疫;Hsp70又可抑制II,1、肿瘤坏死因子(TNF- α)等炎症介质的表达;它能与肿瘤特异性多肽结合,形成热休克蛋白-肽复合物(heatshockprotein-peptidecomplexes,HSP-PC),通过与抗原递呈细胞(antigen-presentingcell,APC)的表面受体结合,可多方面活化机体特异和非特异免疫反应。

[0019] 4.4.1具有肿瘤免疫原性

[0020] HSP具有肿瘤免疫原性,是Srivastava在小鼠肿瘤移植试验中偶然发现的。他在试验中获得一系列排斥肿瘤的抗原,分析发现这些抗原属于HSP,分别是Hsp90、Hsp70和Hsp60,但从正常组织中提取的HSP不具有免疫活性。后来证实,所获得的抗原并非单一的HSP,而是HSP和多肽的复合物。进一步证实HSP多肽复合物的抗原性来自于多肽,而非HSP本身,HSP是通过参与抗原提呈而起作用的。Hsp70可以和细胞内肿瘤抗原结合,具有调节细胞转化的作用。

[0021] 4.4.2 HSP可以作为肿瘤的标志物

[0022] 有许多报道证实,肿瘤细胞中的HSP明显多于正常细胞,并且不同部位的肿瘤组织中,HSP表达的改变并不一致,可以作为肿瘤进展的标志物。

[0023] 4.4.3参与抗感染和自身免疫反应

[0024] 人体在正常状态下少量表达HSPs。其含量仅占总蛋白的5%—10%,而且受自身免疫调节网络的作用,不会引起免疫应答反应。而当病原体感染机体时,病原体相对抗体及其机体针对病原体均可合成HSPs,二者HSPs同源性高于50%,由此构成HSP在不同个体中介导抗感染免疫或自身免疫反应的基础。另外,Hsp70还参与自身免疫,机体产生的致敏T淋巴细胞及其抗体既识别外来抗原,也识别自身成分,或者病原体产生Hsp70与病原体形成免疫显性抗原,均可通过“交叉反应性”共同抗原决定簇而攻击自身细胞,导致自身免疫性疾病。如在类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化及颈动脉粥样硬化等疾病都可在患者血清中检测出高水平的Hsp70自身抗体。

[0025] 4.4.4免疫调节作用

[0026] Suzue等将鸡卵清白蛋白大片段(aa161276)融合到肺炎分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) Hsp70的N端,纯化后免疫小鼠,可诱导特异性CTL应答。研究显示Hsp70能激活NK细胞,并促进DC的成熟。Chen等以人乳头瘤病毒16 (HPV16) E7蛋白为模型抗原,将肺炎分枝杆菌Hsp70基因连接到E7基因下游,构建融合蛋白质粒,基因枪接种后,诱导产生的CTL应答提高了至少30倍。该质粒引起的免疫应答能100%保护肿瘤细胞对小鼠的攻击,并对实验室建立的小鼠肿瘤模型有较好的疗效。Hauser等将人Hsp70基因连接到HPV16E7蛋白基因的下游,构建成表达分泌性融合蛋白的核酸疫苗,免疫小鼠后,与只表达抗原基因的核酸疫苗相比,其特异性抗体滴度及CTL应答水平均显著提高。

[0027] 4.5 Hsp70与病毒感染和复制的关系

[0028] 在病毒DNA的复制过程中,除需要自身所编码蛋白质的参与外,还要自身编码或依赖宿主细胞中如Hsp70 (Hsc70、DnaK)、Hsp40 (DnaJ)、Hsp60 (GroEL)、Hsp90 (HtpG、Grp)、Hsp100 (C1P) 等分子伴侣的参与。Hu等证实乙型肝炎病毒RNP的合成需要宿主细胞的一些成分参与包括Hsp90、p23及ATP水解功能:Hu等研究表明HBVp01与宿主因子如Hsp90复合物相互作用,这对病毒基因组的复制及病毒粒子的装配是关键的一步。Park等报道Hsp60能与HBVp01相互作用,对于HBVp01的成熟及活化有着重要意义。最新研究发现,Hsc70可以介导丙型肝炎病毒 (HCV) 颗粒的感染和释放。HSP在病毒复制中的作用,为抗病毒药物研究提供了一条新的思路。Hsp70在多数病毒感染细胞内均呈现高表达,表明其与病毒的复制与感染有相互联系。

[0029] 4.6 Hsp70在疾病研究上的应用

[0030] Hsp70生物学作用和功能十分广泛,在疾病中的作用与意义非常重大,其中以HSP与肿瘤以及病毒感染的关系研究最多。近来研究表明,HSP与获得性免疫缺陷综合征、传染性海绵状脑病、传染性疾病、心血管疾病、人类应激性疾病等有关。

[0031] 在细胞内,大多数天然蛋白质能自发形成比较稳定的天然结构,或被配体和代谢因子稳定。蛋白质的错误折叠、聚集、沉淀影响蛋白质的正常功能,导致一些疾病的发生。如神经退行性疾病就源于细胞内或细胞外错误折叠蛋白形成的聚集体所引起的脑损伤,包括老年痴呆症(Alzheimerdisease,AD)、帕金森氏病(Pakinsondisease,PD)等。

[0032] 另外,在脑缺血和心肌缺血再灌注中,虽然大部分蛋白质的合成受到抑制,但是诱导性Hsp70水平却大量提高,Hsp70在脑缺血早期对神经细胞有保护作用,缺血后期对细胞的修复起到重要作用。

[0033] Hsp70-肽疫苗在传染性疾病中的研究越来越受到重视,主要集中在病毒性疾病方面,如乙型肝炎、艾滋病、流感等。乙型肝炎病毒特异性的CTL对于控制病毒感染、治疗乙肝及乙肝继发性肝癌具有决定性作用,而Hsp70-肽疫苗能有效激活CTL,这为乙肝的防治开辟了新思路。Hsp70-肽疫苗,激发的主要是以CTL为主的细胞免疫,可以作为治疗性疫苗,这是与普通疫苗的最大区别。Hsp70-肽疫苗作为一类新型的治疗性疫苗,为这些疾病的防治提供了新的思路,带来新的希望。

[0034] 自从Hsp70被发现以来,人们已对其结构、功能和基因转录调控等方面有了比较深入的认识,由于其独特的生物学特性及功能,在生物体内广泛地参与了多种复杂的功能活动,已成为分子生物学的一大热点,并逐渐变为临床多种疾病治疗的新途径。可以预见,随着生物技术的不断发展,人们必将对Hsp70家族成员有更深入的认识,将为认识、诊断和治疗多种疾病带来新的思路,并能开发出以它们为作用靶的全新药物。Hsp70及其相关药物必将得到广泛的应用,为人类征服多种疾病做出贡献。

[0035] 目前已知的热休克蛋白70 (HSP70) 检测方法主要有RIA (radioimmunoassay放射免疫测定法) 法、均相酶免疫检测法、酶联免疫法 (ELISA)、高效液相色谱法、气相色谱法和气相色谱和质谱联用法 (GC-MS)。但是,这些方法都存在一定的缺陷,RIA法污染大、ELISA法自动化程度低且操作复杂繁琐,高效液相色谱法、气相色谱法和气相色谱和质谱联用法不适合广泛用于临床检测。

[0036] 因此,目前尚需一种污染小、灵敏度高、操作简单、自动化程度高、特异性好、成本低的热休克蛋白70 (HSP70) 的快速定量检测方法。

发明内容

[0037] 本发明旨在开发一种灵敏度高、无污染、操作简单、特异性好并且成本低廉的热休克蛋白70 (HSP70) 的快速定量检测方法。

[0038] 基于上述目的,本发明提供一种人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,试剂盒组成包括:校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液,其中,校准品为含一系列浓度的热休克蛋白70 (HSP70) 抗原,用于建立标准曲线;质控品为含一定浓度热休克蛋白70 (HSP70) 抗原的缓冲液配制而成;试剂A为含一定浓度磁微粒标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体溶液;试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体溶液;清洗液浓缩液用于配制清洗液;发光底物液为碱性磷酸酶 (ALP) 催化的

发光底物溶液;检测方法包括:

[0039] (1) 免疫反应:将待测样品与质控品、50 μ l试剂A、50 μ l试剂B依次加入反应管中,37 $^{\circ}$ C条件下混合温育15min;

[0040] (2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200–500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2–4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0041] (3) 读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

[0042] (4) 算出含量:将待测样本的发光强度与校准品的标准曲线比对,使用四参数 Logistic 方程拟合可计算出待测样本中热休克蛋白70 (HSP70) 的含量。

[0043] 另一方案,所述人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述试剂A的配置方法包括:将表面含有羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒进行磁分离,然后用活化缓冲液清洗3次;混悬后加入活化剂,活化后的磁微粒溶液与热休克蛋白70 (HSP70) 抗体按比例混合,使得热休克蛋白70 (HSP70) 抗体被共价偶联在磁微粒表面。

[0044] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述活化缓冲液为摩尔浓度0.05M的 (2- (N-吗啡啉) 乙磺酸) MES, pH6.0, 所述活化剂为1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC)。

[0045] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述比例为20:1。

[0046] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述试剂B的配置方法包括:热休克蛋白70 (HSP70) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 分别加入活化剂,除盐;活化后的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 按比例混合;分离纯化,除去未连接的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体和碱性磷酸酶 (ALP),将连接物保存于4 $^{\circ}$ C。

[0047] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,热休克蛋白70 (HSP70) 抗体加入的活化剂为2-Iminothiolane hydrochloride (2-IT),碱性磷酸酶 (ALP) 加入的活化剂为Succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)。

[0048] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述比例为1:1。

[0049] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述除盐为使用Sephadex G25凝胶柱子除盐,所述分离纯化为使用Superdex200凝胶层析柱分离纯化。

[0050] 另一方案,人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,建立标准曲线的方法包括:

[0051] (1) 免疫反应:将不同浓度的50 μ l的校准品分别与质控品、50 μ l试剂A、50 μ l试剂B依次加入反应管中,37 $^{\circ}$ C条件下混合温育15min;

[0052] (2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200–500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2–4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0053] (3) 读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

[0054] (4) 根据检测的数值使用四参数Logistic方程拟合, 获得热休克蛋白70 (HSP70) 浓度-发光值标准曲线。

[0055] 另一方案, 人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 校准品的系列浓度分别为0ng/ml, 0.8ng/ml, 2.5ng/ml, 9.5ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml。

[0056] 上述步骤表明, 本发明采用的竞争法的反应模式, 利用化学发光检测技术与磁微粒免疫分离技术相结合的原理, 定量检测人血清或血浆样品中的热休克蛋白70 (HSP70) 含量, 确保了检测的灵敏度, 由于实验采用竞争法不存在H00K效应, 无污染、特异性强、操作简单、并且对样品的前处理要求低、可快速高通量检测大批量样本, 便于临床试剂应用。本发明为临床检测人血清中的热休克蛋白70 (HSP70) 提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。

附图说明

[0057] 图1为本发明人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法流程图。

具体实施方式

[0058] 本发明的目的在于提供一种具有检测范围宽、灵敏度高、操作简便的检测人体热休克蛋白70 (HSP70) 管式磁微粒分离化学发光免疫检测方法。

[0059] 本发明的上述目的通过以下技术方案实现:

[0060] 人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法原理如下:

[0061] 本发明为双抗体夹心法, 应用磁微粒分离技术与化学发光免疫分析系统相结合定量检测血清样本中热休克蛋白70 (HSP70) 的含量。如图1所示, 反应的技术原理为: 磁微粒连接的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体与碱性磷酸酶 (ALP) (AP) 标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体同待测样本或校准品或质控品中的热休克蛋白70 (HSP70) 发生免疫反应, 结合形成“三明治”结构的复合物。随后在外加磁场中直接沉淀, 将免疫反应形成的复合物与未结合的其它物质磁分离。去上清后清洗沉淀的复合物, 加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解, 形成不稳定的激发态中间体, 当激发态中间体回到基态时便发出光子, 形成发光反应, 即可使用发光仪检测反应的发光强度。发光强度与样本中热休克蛋白70 (HSP70) 的浓度成正比, 使用四参数Logistic方程拟合可计算出样本中热休克蛋白70 (HSP70) 的含量。

[0062] 测定人体热休克蛋白70 (HSP70) 含量的磁微粒化学发光检测试剂盒的组成

[0063] 本发明生成的人体热休克蛋白70 (HSP70) 磁微粒分离化学发光免疫测定的试剂盒组成包括: 1、校准品 (含一系列浓度的热休克蛋白70 (HSP70) 抗原, 用于建立标准曲线); 2、质控品 (含一定浓度热休克蛋白70 (HSP70) 抗原的缓冲液配制而成); 3、试剂A (含一定浓度磁微粒标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体溶液); 4、试剂B (含一定浓度碱性磷酸酶 (ALP) 标记的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体溶液); 5、清洗液浓缩液 (用于配制清洗液); 6、底物溶液 (酶催化的发光底物)。

[0064] 下面通过具体实施例对本发明进行详细说明, 但并不限定本发明。

[0065] 试剂

[0066] 本发明检测试剂盒中的所有组分均能通过商业途径从生物试剂或化学试剂公司

购买得到。本发明中所用标记碱性磷酸酶单克隆抗体为Sigma公司生产,货号为H5147;标记磁微粒单克隆抗体为HyTest公司生产,货号为4HSP70;抗原为HyTest公司生产,货号为:8HSP70;碱性磷酸酶购自英国BBI公司,货号为:ALPI12G;SMCC购自Thermo fisher scientific公司,货号为:22360;2-IT购自Thermo fisher scientific公司,CAS:4781-83-3;货号为:26101;羧基修饰微粒购自Thermo fisher scientific公司;EDC购自SIMGA公司,CAS:25952-53-8,货号:E7750。发光底物、清洗浓缩液均来自北京利德曼生化股份有限公司成品试剂盒。

[0067] 实施例1:磁微粒标记热休克蛋白70 (HSP70) 抗体

[0068] 取20mg羧基修饰微粒溶液,将具有超顺磁性,粒径均匀,表面含有羧基(COOH-)活性基团的磁微粒在磁场作用下沉降(磁分离)10分钟,去上清,沉降的磁微粒用活化缓冲液摩尔浓度0.05M的(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)MES,pH6.0缓冲液清洗3次,每次用量2ml。

[0069] 将洗涤后磁微粒用1.0ml活化缓冲液摩尔浓度0.05M的(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)MES,pH6.0的缓冲液充分混悬后加入活化剂1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC),室温混悬反应30分钟,EDC反应摩尔浓度为7.5mM。

[0070] 取1.0mg的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体,浓缩至2.5mg/mL。

[0071] 将浓缩至2.5mg/mL的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体按1.0mg的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体加入20mg活化后的磁微粒溶液混合,轻摇混匀,在4℃混悬条件下反应6.5小时,使得热休克蛋白70 (HSP70) 抗体被共价偶联在磁微粒表面,制得试剂A。

[0072] 实施例2:碱性磷酸酶 (ALP) 标记热休克蛋白70 (HSP70) 抗体

[0073] 取1.0mg的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体,浓缩至2.5mg/mL,加入浓度为13.76mg/mL的活化剂2-Iminothiolane hydrochloride (2-IT) 溶液5μL,室温反应15分钟。使用Sephadex G25凝胶柱子除盐,收集活化后的抗体。

[0074] 取1.2mg碱性磷酸酶 (ALP),浓缩至2.5mg/mL,加入浓度为6.69mg/mL的活化剂Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 溶液12μL,室温反应15分钟。使用Sephadex G25凝胶柱子除盐,收集活化后的碱性磷酸酶 (ALP)。

[0075] 将活化后热休克蛋白70 (HSP70) 抗体与碱性磷酸酶 (ALP) 按1.0mg的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体加入1.0mg碱性磷酸酶 (ALP) 的比例混合,放置4℃下反应18小时。

[0076] 使用Supperdex200凝胶层析柱分离纯化,除去未连接的热休克蛋白70 (HSP70) 抗体和碱性磷酸酶 (ALP),将连接物保存于4℃,制得试剂B。

[0077] 实施例3:人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法

[0078] (1) 免疫反应:将实施例1的50μl的校准品系列(浓度分别为0,0.8,2.5,9.5,25,50ng/ml)分别与质控品、实施例1的50μl试剂A、实施例2的50μl试剂B依次加入反应管中,37℃条件下混合温育15min;

[0079] (2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200-500μl清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2-4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0080] (3) 读值:加入发光底物液150μl,碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度(RLU);

[0081] (4) 根据检测的数值使用四参数Logistic方程拟合,获得热休克蛋白70 (HSP70) 浓度-发光值标准曲线。

[0082] (5) 将50μl的待测样品与实施例1的50μl试剂A、实施例2的50μl试剂B依次加入反应管中,37℃条件下混合温育15min;

[0083] (6) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200-500μl清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2-4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0084] (7) 读值:加入发光底物液150μl,ALP催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度(RLU);

[0085] (8) 将待测样本的发光强度与步骤(4)的标准曲线比对,使用四参数Logistic方程拟合可计算出待测样本中热休克蛋白70(HSP70)的含量。

[0086] 实施例4:试剂盒性能测试

[0087] 检测本试剂盒的灵敏度、线性范围、准确性、精密度。具体操作步骤如下:

[0088] 一、试剂准备:

[0089] 实验前,先取出试剂A(磁微粒标记的热休克蛋白70(HSP70)抗体溶液)、试剂B(碱性磷酸酶(ALP)标记的热休克蛋白70(HSP70)抗体溶液)、校准品、发光底物。

[0090] 二、仪器准备:

[0091] 本试剂盒适用于北京利德曼生化股份有限公司CI1000、CI2000全自动化学发光免疫分析仪、英国IDS型化学发光免疫分析仪。

[0092] 三、操作步骤:

[0093] 1、剂量-反应曲线线性:用试剂盒最高浓度点校准品(F点)用该项目校准品稀释液倍比稀释到接近该项目分析灵敏度,形成若干浓度点样本。试剂盒定标后测试梯度样本,每个稀释浓度测试3次,分别求出测定结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(1)计算线性回归的相关系数(r)。

$$[0094] \quad r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \dots\dots\dots (1)$$

[0095] 合格标准:1.0-200ng/ml内, $r > 0.9900$ 。

[0096] 2、准确度:新配制并检验合格的试剂(包括STD,R1,R2,M)放入37℃温箱共放置7天(可超过7天)。若干天取出试剂,定标后(用4℃保存合格校准品)检测试剂准确性,质控偏差小于20%。

[0097] 合格标准:校准品降幅小于10%,试剂盒降幅小于50%,准确度符合要求。

[0098] 3、最低检测限:用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的相对发光强度(RLU)值,计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD(正反应)或M-2SD(负反应)的RLU值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。

[0099] 4、精密度:分析方法(分析内):用高、低两个水平浓度的质控血清或新鲜人血清检测试剂,重复测试10次,按以下公式计算测定结果的均值(\bar{x})和变异系数(CV)。

$$[0100] \quad \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$[0101] \quad CV = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - Xi)^2}{(\bar{X})^2 (n-1)}}$$

[0102] 式中:Xi——待测血清样本的测定结果; \bar{X} ——待测血清样本的均值;n——测定次数,此处为10。

[0103] 分析方法(分析间):分三次实验,用高、低两个水平浓度的质控血清或新鲜人血清检测试剂,重复测试10次,每一样本均得到30个结果,按以下公式计算测定结果的均值(\bar{X})和变异系数(CV)。

$$[0104] \quad \bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$$

$$[0105] \quad CV = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - Xi)^2}{(\bar{X})^2 (n-1)}}$$

[0106] 式中:Xi——待测血清样本的测定结果; \bar{X} ——待测血清样本的均值;n——测定次数,此处为30。

[0107] 合格标准:分析内:不大于10%;分析间:不大于15%。

[0108] 5、特异性:按试剂盒产品标准要求,配制一定浓度的交叉反应物作为样本用试剂盒进行检测,检测结果与样本配制浓度的比值(%)即为对该样本的交叉反应率。

[0109] 合格标准:<1.0%。

[0110] 性能指标检测结果:

[0111] 1、剂量-反应曲线线性:使用四参数Logistic方程拟合,在0.5-500ng/mL范围内,剂量-反应曲线相关系数 $r \geq 0.99$ 。

[0112] 2、准确度:通过稀释回收评价其准确度,所得结果稀释回收率在85%-115%之间。

[0113] 3、最低检测限:<0.05ng/mL。

[0114] 4、精密度:分析内 $\leq 8\%$,分析间 $\leq 10\%$ 。

[0115] 5、特异性:交叉率均小于0.1%。

[0116] 上述步骤表明,本发明采用的竞争法的反应模式,利用化学发光检测技术与磁微粒免疫分离技术相结合的原理,定量检测人血清或血浆样品中的热休克蛋白70 (HSP70) 含量,确保了检测的灵敏度,由于实验采用竞争法不存在HOOK效应,无污染、特异性强、操作简单、并且对样品的前处理要求低、可快速高通量检测大批量样本,便于临床试剂应用。本发明为临床检测人血清中的热休克蛋白70 (HSP70) 提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。

[0117] 本发明提供的人体热休克蛋白70 (HSP70) 含量的磁微粒化学发光检测试剂盒可以与全自动化学发光分析仪联用,操作步骤极大简化,加大了检测速度和检测通量,提高了检测效率,同时避免了人为操作导致的误差。

[0118] 所属领域的普通技术人员应当理解:以上任何实施例的讨论仅为示例性的,并非旨在暗示本发明的范围(包括权利要求)被限于这些例子;在本发明的思路下,以上实施例或者不同实施例中的技术特征之间也可以进行组合,并存在如上所述的本发明的不同方面的许多其它变化,为了简明它们没有在细节中提供。因此,凡在本发明的精神和原则之内,

所做的任何省略、修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

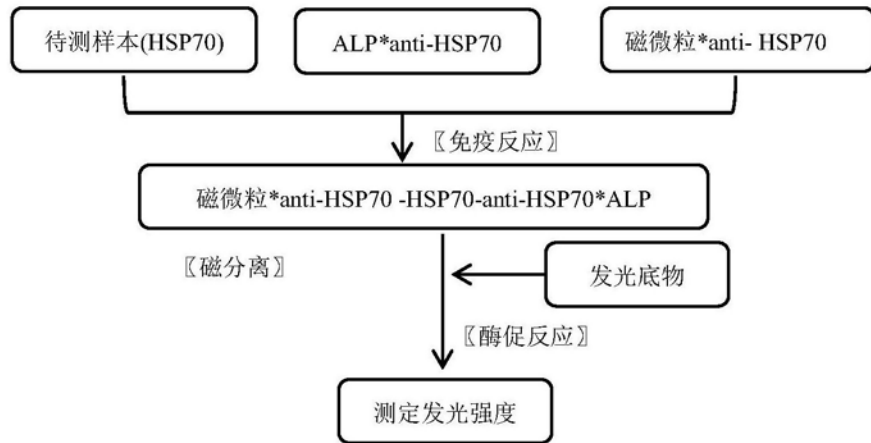


图1

专利名称(译)	用于检测热休克蛋白70(HSP70)的磁微粒分离化学发光免疫测定法		
公开(公告)号	CN109613255A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201811392775.2	申请日	2018-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
[标]发明人	郭健夫 桂颖 王义君		
发明人	郭健夫 桂颖 王义君		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/58 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/581 G01N33/68		
代理人(译)	余光军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人体热休克蛋白70(HSP70)磁微粒分离化学发光免疫检测方法，试剂盒组成包括：校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液，其中，校准品为含一系列浓度的热休克蛋白70(HSP70)抗原，用于建立标准曲线；质控品为含一定浓度热休克蛋白70(HSP70)抗原的缓冲液配制而成；试剂A为含一定浓度磁微粒标记的热休克蛋白70(HSP70)抗体溶液；试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的热休克蛋白70(HSP70)抗体溶液；清洗液浓缩液用于配制清洗液；发光底物液为碱性磷酸酶(ALP)催化的发光底物溶液。本发明极大地提高了免疫反应的信号强度和灵敏度，使低含量物质在进行免疫结合时也能产生很强的化学发光信号，为人体热休克蛋白70(HSP70)的检测提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。

