



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024940 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911422978.6

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 广州源起健康科技有限公司

地址 510655 广东省广州市广州高新技术
产业开发区瑞泰路2号C栋二层自编
C01号

(72)发明人 李根平 庄雨璋 李爱霞

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

代理人 颜希文

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

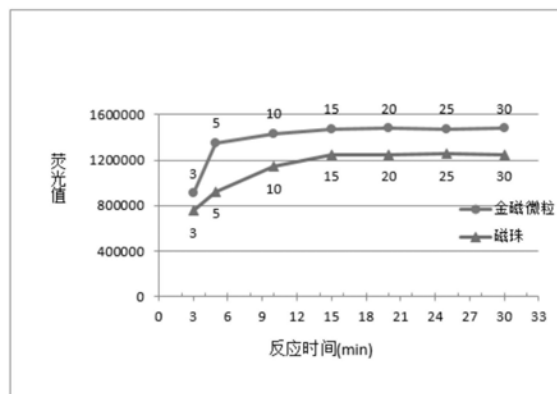
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,属于免疫学检测领域。本发明提供基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,包括免疫金磁微粒液的制备,用镧系元素螯合物标记抗原或抗体,获得荧光标记物,将待检测样品加入免疫金磁微粒液中,再荧光标记物,混匀孵育,然后洗涤金磁微粒,反应体系中加入荧光增强物,然后检测反应体系中标记物的荧光。本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,首次将金磁微粒包被生物原料技术用于时间分辨荧光检测,大大提高检测范围,缩短反应时间,提高灵敏度,金磁微粒可以和不同的探针分子结合,使检测同一样本中不同的待测物成为可能。



1. 一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 免疫金磁微粒液的制备,具体操作如下:

(1.1) 包被抗体或抗原的预处理:取抗体或抗原加入离心管中,离心,用结合缓冲液洗涤,浓缩;

(1.2) 金磁微粒与抗体或抗原的结合:取金磁微粒于离心管中,结合磁力架,用结合缓冲液洗涤,弃上清液,然后往离心管中再加入步骤(1.1)中预处理后的抗体或抗原,振荡混匀孵育;

(1.3) 封闭:将步骤(1.2)中孵育后的金磁微粒用封闭液洗涤,再加入封闭液,然后振荡混匀封闭;

(1.4) 将完成步骤(1.3)的金磁微粒用保存液洗涤,再加入保存液,然后低温下保存,即可制得免疫金磁微粒液;

(2) 用镧系元素螯合物标记抗原或抗体,获得荧光标记物;

(3) 将待检测样品加入步骤(1)所述的免疫金磁微粒液中,再加入步骤(2)所述的荧光标记物,混匀孵育,然后洗涤金磁微粒;

(4) 往完成步骤(3)的反应体系中加入荧光增强物,然后检测反应体系中标记物的荧光,即可获得检测样品的信息。

2. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1.1)中,所述离心管为30KD的超滤离心管,所述离心的速度为10000r/min,所述离心的温度为4℃,所述离心的时间为9min~10min,所述结合缓冲液为0.05M pH8.0~9.0的Tris-HCl缓冲液,所述洗涤次数为3~5次。

3. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1.2)中,所述结合缓冲液为0.05M pH8.0~9.0的Tris-HCl缓冲液,所述洗涤次数为3~5次,所述抗体或抗原与金磁微粒混合的质量比为1:50,所述孵育的温度为20℃~28℃。

4. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1.3)中,所述用封闭液洗涤的次数为3~5次,再加入封闭液后的金磁微粒浓度为2mg/ml,所述封闭的温度为20℃~28℃,所述封闭的时间为30min,所述封闭液为含有质量浓度5% BSA的Tris-HCl缓冲液,所述的Tris-HCl缓冲液的体积摩尔浓度为0.05M,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为8.0~9.0。

5. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1.4)中,所述保存液为含有体积百分浓度0.1% Tween-20的Tris-HCl缓冲液,所述Tris-HCl缓冲液的体积摩尔浓度为0.05M,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为8.0~9.0,所述用保存液洗涤的次数为3~5次,再加入保存液后的金磁微粒浓度为10mg/ml,所述低温为2~8℃。

6. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(2)中,获得荧光标记物的具体操作如下:

(2.1) 标记抗体或抗原的预处理:取抗体或抗原加入离心管中,离心,用标记缓冲液洗涤,浓缩;抗体与镧螯合物质量比为1:3

(2.2) 镧系元素螯合物标记抗原或抗体:取溶解后的镧系元素螯合物与步骤(2.1)中预处理后的抗体或抗原,以质量比3:1放入旋转培养器中,反应16-20h,获得镧系元素螯合物标记物,然后纯化镧系元素螯合物标记物,低温保存,即可获得荧光标记物。

7. 如权利要求6所述的检测方法,其特征在于,步骤(2.1)中,所述离心管为30KD的超滤离心管,所述离心的速度为10000r/min,所述离心的温度为4℃,所述离心的时间为9min~

10min,所述标记缓冲液为0.05M pH8.0~9.0的CBS缓冲液,所述洗涤次数为3~5次。

8.如权利要求6所述的检测方法,其特征在于,步骤(2.2)中,所述镧系元素螯合物的镧系元素为铈或钐,所述镧系元素螯合物的螯合剂为异硫氰酸苯基-EDTA、异硫氰酸苯甲基-DTTA、P-异硫氰基苄基-DTTA或二乙烯三胺五醋酸氨基苯基-EDTA,所述反应的温度为20℃~28℃,所述纯化为用SepHadexTM G-50葡聚糖凝胶柱纯化镧系元素螯合物标记物,所述低温为2~8℃。

9.如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(3)中,所述孵育时间5min,所述孵育温度37℃,所述洗涤次数为4次。

10.如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(4)中,以质量浓度计,所述荧光增强物包括0.03%乙酸钠、0.0002~0.0009%β-NTA、0.0024%TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇和0.05%Triton X-100水溶液,用时间分辨荧光仪检测反应体系中标记物的荧光。

一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 现有技术中的免疫检测方法主要有免疫比浊法、免疫层析法、酶联免疫法、化学发光法等。其中免疫层析法具有操作简单快速的优点,但灵敏度低且定量不准确;酶联免疫法灵敏度高,样品量大可定量检测,但操作时间长且自动化低;免疫比浊法和化学发光法较为敏感、准确,可应用于全自动检测,但相应的标记物研发门槛高,需要昂贵的仪器且耗时较长,适合处理大量样本,无法满足一个样本进行多项目指标简便快速检测的目的;时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)灵敏度能达到化学发光法一致的水平,不仅检测设备造价较低,并且标记技术在国内已相当成熟、检测成本低廉。而传统的时间分辨检测,仍以空白酶标板的物理吸附为主,检测过程耗时长。因此,需要开发一种具有简便快速、检测成本低、检测灵敏度高、线性范围宽、一个样本可以检测多项指标的检测方法,该方法将具有很好的应用前景。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种检测成本低、检测灵敏度高、线性范围宽、一个样本可以检测多项指标且简便快速的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法。

[0004] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,包括如下步骤:

[0005] (1) 免疫金磁微粒液的制备,具体操作如下:

[0006] (1.1) 包被抗体或抗原的预处理:取抗体或抗原加入离心管中,离心,用结合缓冲液洗涤,浓缩;

[0007] (1.2) 金磁微粒与抗体或抗原的结合:取金磁微粒于离心管中,结合磁力架,用结合缓冲液洗涤,弃上清液,然后往离心管中再加入步骤(1.1)中预处理后的抗体或抗原,振荡混匀孵育;

[0008] (1.3) 封闭:将步骤(1.2)中孵育后的金磁微粒用封闭液洗涤,再加入封闭液,然后振荡混匀封闭;

[0009] (1.4) 将完成步骤(1.3)的金磁微粒用保存液洗涤,再加入保存液,然后低温下保存,即可制得免疫金磁微粒液;

[0010] (2) 用镧系元素螯合物标记抗原或抗体,获得荧光标记物;

[0011] (3) 将待检测样品加入步骤(1)所述的免疫金磁微粒液中,再加入步骤(2)所述的荧光标记物进行反应,然后洗涤金磁微粒;

[0012] (4) 往完成步骤(3)的反应体系中加入荧光增强物,然后检测反应体系中标记物的荧光,即可获得检测样品的信息。

[0013] 本发明提供一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,将时间分辨荧光免疫分析与金磁微粒包被生物原料技术相结合,使得检测方法简便快速、检测成本低、检测灵敏度高、线性范围宽、定量准确、一个样本可以检测得到多项指标。

[0014] 本发明所述金磁微粒是指内核为磁性纳米颗粒,表面包覆材料为金的磁性纳米复合微粒;其不仅具有磁性颗粒的磁性,比表面积大,稳定性好的特性,还具有纳米金良好的生物相容性,表面等离子共振的光学性质,以及无需偶联剂而易于和生物分子结合,易于修饰等特性。

[0015] 本发明首次将金磁微粒包被生物原料技术用于时间分辨荧光检测。

[0016] 优选地,步骤(1.1)中,所述离心管为30KD的超滤离心管,所述离心的速度为10000r/min,所述离心的温度为4℃,所述离心的时间为9min~10min,所述结合缓冲液为0.05M pH8.0~9.0的Tris-HCl缓冲液,所述洗涤次数为3~5次。

[0017] 优选地,步骤(1.2)中,所述结合缓冲液为0.05M pH8.0~9.0的Tris-HCl缓冲液,所述洗涤次数为3~5次,所述抗体或抗原与金磁微粒混合的质量比为1:50,所述孵育的温度为20℃~28℃。

[0018] 优选地,步骤(1.3)中,所述用封闭液洗涤的次数为3~5次,再加入封闭液后的金磁微粒浓度为2mg/ml,所述封闭的温度为20℃~28℃,所述封闭的时间为30min,所述封闭液的为含有质量浓度5%BSA的Tris-HCl缓冲液,所述的Tris-HCl缓冲液的体积摩尔浓度为0.05M,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为8.0~9.0。

[0019] 优选地,步骤(1.4)中,所述保存液为含有体积百分浓度0.1%Tween-20的Tris-HCl缓冲液,所述Tris-HCl缓冲液的体积摩尔浓度为0.05M,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为8.0~9.0,所述用保存液洗涤的次数为3~5次,再加入保存液后的金磁微粒浓度为10mg/ml,所述低温为2~8℃。

[0020] 优选地,步骤(2)中,获得荧光标记物的具体操作如下:

[0021] (2.1) 标记抗体或抗原的预处理:取抗体或抗原加入离心管中,离心,用标记缓冲液洗涤,浓缩;

[0022] (2.2) 镧系元素螯合物标记抗原或抗体:取溶解后的镧系元素螯合物与步骤(2.1)中预处理后的抗体或抗原,以质量比3:1放入旋转培养器中,反应16-20h,获得镧系元素螯合物标记物,然后纯化镧系元素螯合物标记物,低温保存,即可获得荧光标记物。

[0023] 本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法中,是液相反应系统,反应更加充分,加上使用稀土螯合物荧光示踪物和金磁微粒的放大系统,使得检测灵敏度和检测重复性要远远好于传统微孔板式TRFIA和层析方法。

[0024] 优选地,步骤(2.1)中,所述离心管为30KD的超滤离心管,所述离心的速度为10000r/min,所述离心的温度为4℃,所述离心的时间为9min~10min,所述标记缓冲液为0.05M pH8.0~9.0的CBS缓冲液,所述洗涤次数为3~5次。

[0025] 优选地,步骤(2.2)中,所述镧系元素螯合物的镧系元素为铕或钐,所述镧系元素螯合物的螯合剂为异硫氰酸苯基-EDTA、异硫氰酸苯甲基-DTTA、P-异硫氰基苄基-DTTA或二乙烯三胺五醋酸氨基苯基-EDTA,所述反应的温度为20℃~28℃,所述纯化为用SepHdex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化镧系元素螯合物标记物,所述低温为2~8℃。

[0026] 本发明采用镧系螯合物铕或钐作为标记物,其具有较宽的激发光谱、较窄发射光

谱,有利于降低成本,提高灵敏度;紫外光激发具有较高量子产率、较大斯托克斯(Stokes)位移,避免激发光谱和荧光发射光谱以及生物基质发射的光谱重合,荧光衰变时间长等优点,比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0027] 优选地,步骤(3)中,所述孵育时间5min,所述孵育温度37℃,所述洗涤次数为4次。

[0028] 优选地,步骤(4)中,以质量浓度计,所述荧光增强物包括0.03%乙酸钠、0.0002~0.0009%β-NTA、0.0024%TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇和0.05%Triton X-100水溶液,用时间分辨荧光仪检测反应体系中标记物的荧光。

[0029] 将本发明所述检测方法中的步骤(1)所述的免疫金磁微粒液、步骤(2)所述的荧光标记物、清洗液(0.8~1.5%Tween-20,0.02%Proclin300,pH 7.2~7.50.05M Tris-Hcl缓冲液)、增强物分装到空试剂条中,再将分装好的试剂条进行封膜,获得试剂条;然后制定标准曲线,将标准曲线保存到RFID卡中;将所述试剂条,说明书,所述RFID卡和合格证装入盒入库。

[0030] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0031] (1)本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,首次将金磁微粒包被生物原料技术用于时间分辨荧光检测;金磁微粒不仅具有磁性颗粒的磁性,比表面积大,稳定性好的特性,还具有纳米金良好的生物相容性,无需影响生物活性且昂贵的偶联剂而易于和生物分子结合,因此结合生物分子后的免疫金磁微粒更稳定,可以采用磁分离技术,形成的免疫金磁微粒在外加磁场中直接沉淀,不需要复杂的离心过程,即可以达到免疫金磁微粒快速、简便的洗涤效果;金磁微粒具有较大的结合表面积,能在液相中分散而充分反应,大大提高检测范围,缩短反应时间,提高灵敏度;金磁微粒可以和不同的探针分子结合,使检测同一样本中不同的待测物成为可能。

[0032] (2)本发明的检测方法中,采用镧系螯合物作为标记物,其具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱,有利于降低成本,提高灵敏度;紫外光激发具有较高量子产率、较大Stokes位移,避免激发光谱和荧光发射光谱以及生物基质发射的光谱重合,荧光衰变时间长等优点,比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0033] (3)本发明的检测方法中,采用的是液相反应系统,反应更加充分,加上使用稀土螯合物荧光示踪物和金磁微粒的放大系统,使得检测灵敏度和检测重复性要远远好于传统微孔板式TRFIA和层析方法。

[0034] (4)本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,为多项目指标快速检测提供了基础平台,常规的样本在配合本发明的检测方法时,能实现检测多个项目指标或者单一试剂条可以同时检测多份样本的效果。

附图说明

[0035] 图1为金磁微粒时间分辨测试结果图;

[0036] 图2为胶体金免疫层析测试结果图;

[0037] 图3为化学发光测试结果图;

[0038] 图4为金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法与磁珠的时间分辨荧光免疫检测方法对比的结果图。

具体实施方式

[0039] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0040] 实施例1

[0041] 本实施例为本发明的一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,检测CRP和SAA试剂盒,包括如下步骤:

[0042] (1) 免疫金磁微粒液的制备,具体操作如下:

[0043] (1.1) 包被抗体或抗原的预处理:分别取CRP抗体和SAA抗体加入为30KD的超滤离心管中,4℃条件下以10000r/min离心9min,用结合缓冲液0.05M pH8.0的Tris-HCl洗涤3次,然后浓缩;

[0044] (1.2) 金磁微粒与抗体或抗原的结合:按照抗体与金磁微粒混合的质量比为1:50,取金磁微粒于离心管中,结合磁力架,用结合缓冲液为0.05M pH8.0的Tris-HCl洗涤3次,弃上清液,然后往离心管中再加入步骤(1.1)中预处理后的CRP抗体和SAA抗体,25℃温度条件下,振荡混匀孵育;

[0045] (1.3) 封闭:将步骤(1.2)中孵育后的金磁微粒用封闭液(含质量浓度5%BSA、体积摩尔浓度为0.05M、pH为8.0的Tris-HCl缓冲液)洗涤3次,再加入封闭液至金磁微粒浓度为2mg/ml,然后在25℃温度条件下,振荡混匀封闭30min;

[0046] (1.4) 将完成步骤(1.3)的金磁微粒用保存液(含有0.1%(v/v) Tween-20、pH8.0.05M的Tris-HCl缓冲液)洗涤3次,再加入保存液至金磁微粒终浓度为10mg/ml,然后2℃温度下直立保存,即可制得免疫金磁微粒液;

[0047] (2) 用镧系元素螯合物标记抗原或抗体,获得荧光标记物;

[0048] (2.1) 标记抗体或抗原的预处理:分别取CRP抗体和SAA抗体加入30KD的超滤离心管中,4℃以10000r/min离心9min~10min,用标记缓冲液0.05M pH8.0的CBS洗涤3次,然后浓缩至CRP抗体和SAA抗体均为1mg/ml;

[0049] (2.2) 镧系元素螯合物标记抗原或抗体:取ETTA-EU与步骤(2.1)中预处理后的CRP抗体,以质量比3:1放入旋转培养器中,25℃反应16h,用SepHadex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化铕标抗体;取ETTA-Sm与步骤(2.1)中预处理后的SAA抗体,以质量比3:1放入旋转培养器中,20℃~28℃反应16h,用SepHadex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化钐标抗体;然后取上述铕标抗体和钐标抗体等体积混合,2℃直立保存;

[0050] (3) 将100μL待检测样品加入20μL步骤(1)所述的免疫金磁微粒液中,再加入100μL步骤(2)所述的荧光标记物(CRP/SAA双抗体标记物),37℃混匀孵育5min,然后洗涤金磁微粒4次;

[0051] (4) 往完成步骤(3)的反应体系中加入荧光增强物(0.03%乙酸钠、0.0002%β-NTA、0.0024%TOP0、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%Triton X-100,各物质的百分含量均为质量浓度)100μL,25℃混匀孵育3min,然后在10分钟内检测反应体系中标记物的荧光,即可获得检测样品的信息。

[0052] 本实施例中,实际的操作步骤及相关参数,已事先拷贝至配套的RFID卡内,实验操作过程只需要按试剂准备过程准备好后,将RFID卡与全自动设备适配即可完成从信息读取、加样到检测的全过程。

[0053] 实施例2

[0054] 本实施例为本发明的一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,检测IL-6抗体和PCT抗体试剂盒,包括如下步骤:

[0055] (1) 免疫金磁微粒液的制备,具体操作如下:

[0056] (1.1) 包被抗体或抗原的预处理:分别取IL-6抗体和PCT抗体加入为30KD的超滤离心管中,4℃条件下以10000r/min离心10min,用结合缓冲液0.05M pH9.0的Tris-HCl洗涤5次,然后浓缩至IL-6抗体和PCT抗体的浓度均为1mg/ml;

[0057] (1.2) 金磁微粒与抗体或抗原的结合:按照抗体与金磁微粒混合的质量比为1:50,取金磁微粒于离心管中,结合磁力架,用结合缓冲液为0.05M pH9.0的Tris-HCl洗涤5次,弃上清液,然后往离心管中再加入步骤(1.1)中预处理后的IL-6抗体和PCT抗体,28℃温度条件下,振荡混匀孵育24h;

[0058] (1.3) 封闭:将步骤(1.2)中孵育后的金磁微粒用封闭液(含质量浓度5%BSA、体积摩尔浓度为0.05M、pH为9.0的Tris-HCl缓冲液)洗涤5次,再加入封闭液至金磁微粒浓度为2mg/ml,然后在28℃温度条件下,振荡混匀封闭30min;

[0059] (1.4) 将完成步骤(1.3)的金磁微粒用保存液(含有0.1%(v/v) Tween-20、pH9.0 0.05M的Tris-HCl缓冲液)洗涤5次,再加入保存液至金磁微粒终浓度为10mg/ml,然后8℃温度下直立保存,即可制得免疫金磁微粒液;

[0060] (2) 用镧系元素螯合物标记抗原或抗体,获得荧光标记物;

[0061] (2.1) 标记抗体或抗原的预处理:分别取IL-6抗体和PCT抗体加入30KD的超滤离心管中,4℃以10000r/min离心10min,用标记缓冲液0.05M pH9.0的CBS洗涤5次,然后浓缩至CRP抗体和SAA抗体均为1mg/ml;

[0062] (2.2) 镧系元素螯合物标记抗原或抗体:取ETTA-EU与步骤(2.1)中预处理后的IL-6抗体,以质量比3:1放入旋转培养器中,28℃反应20h,用SepHadex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化铕标抗体;取ETTA-Sm与步骤(2.1)中预处理后的PCT抗体,以质量比3:1放入旋转培养器中,28℃反应20h,用SepHadex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化钐标抗体;然后取上述铕标抗体和钐标抗体等体积混合,8℃直立保存;

[0063] (3) 将100μL待检测样品加入20μL步骤(1)所述的免疫金磁微粒液中,再加入100μL步骤(2)所述的荧光标记物(IL-6/PCT双抗体标记物),37℃混匀孵育5min,然后洗涤金磁微粒4次;

[0064] (4) 往完成步骤(3)的反应体系中加入荧光增强物(0.03%乙酸钠、0.0002%β-NTA、0.0024%TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%Triton X-100,各物质的百分含量均为质量浓度)100μL,28℃混匀孵育3min,然后在10分钟内检测反应体系中标记物的荧光,即可获得检测样品的信息。

[0065] 本实施例中,实际的实验操作步骤及相关参数,已事先拷贝至配套的RFID卡内,实验操作过程只需要按试剂准备过程准备好后,将RFID卡与全自动设备适配即可完成从信息读取、加样到检测的全过程。

[0066] 实施例3

[0067] 本实施例为本发明的一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,检测CRP和SAA试剂盒,包括如下步骤:

[0068] (1) 免疫金磁微粒液的制备, 具体操作如下:

[0069] (1.1) 包被抗体或抗原的预处理: 分别取CRP抗体和SAA抗体加入为30KD的超滤离心管中, 4℃条件下以10000r/min离心10min, 用结合缓冲液0.05M pH9.0的Tris-HCl洗涤5次, 然后浓缩;

[0070] (1.2) 金磁微粒与抗体或抗原的结合: 按照抗体与金磁微粒混合的质量比为1:50, 取金磁微粒于离心管中, 结合磁力架, 用结合缓冲液为0.05M pH9.0的Tris-HCl洗涤5次, 弃上清液, 然后往离心管中再加入步骤(1.1)中预处理后的CRP抗体和SAA抗体, 20℃温度条件下, 振荡混匀孵育;

[0071] (1.3) 封闭: 将步骤(1.2)中孵育后的金磁微粒用封闭液(含质量浓度5%BSA、体积摩尔浓度为0.05M、pH为9.0的Tris-HCl缓冲液)洗涤5次, 再加入封闭液至金磁微粒浓度为2mg/ml, 然后在20℃温度条件下, 振荡混匀封闭30min;

[0072] (1.4) 将完成步骤(1.3)的金磁微粒用保存液(含有0.1% (v/v) Tween-20、pH8.0~9.0 0.05M的Tris-HCl缓冲液)洗涤5次, 再加入保存液至金磁微粒终浓度为10mg/ml, 然后8℃温度下直立保存, 即可制得免疫金磁微粒液;

[0073] (2) 用镧系元素螯合物标记抗原或抗体, 获得荧光标记物;

[0074] (2.1) 标记抗体或抗原的预处理: 分别取CRP抗体和SAA抗体加入30KD的超滤离心管中, 4℃以10000r/min离心10min, 用标记缓冲液0.05M pH9.0的CBS洗涤5次, 然后浓缩至CRP抗体和SAA抗体均为1mg/ml;

[0075] (2.2) 镧系元素螯合物标记抗原或抗体: 取ETTA-EU与步骤(2.1)中预处理后的CRP抗体, 以质量比3:1放入旋转培养器中, 20℃反应20h, 用SepHdex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化铈标抗体; 取ETTA-Sm与步骤(2.1)中预处理后的SAA抗体, 以质量比3:1放入旋转培养器中, 20℃反应20h, 用SepHdex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化钐标抗体; 然后取上述铈标抗体和钐标抗体等体积混合, 8℃直立保存;

[0076] (3) 将100μL待检测样品加入20μL步骤(1)所述的免疫金磁微粒液中, 再加入100μL步骤(2)所述的荧光标记物(CRP/SAA双抗体标记物), 37℃混匀孵育5min, 然后洗涤金磁微粒4次;

[0077] (4) 往完成步骤(3)的反应体系中加入荧光增强物(0.03%乙酸钠、0.0009%β-NTA、0.0024%TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%Triton X-100、各物质的百分含量均为质量浓度) 100μL, 25℃混匀孵育3分钟, 然后在10分钟内检测反应体系中标记物的荧光, 即可获得检测样品的信息。

[0078] 本实施例中, 实际的实验操作步骤及相关参数, 已事先拷贝至配套的RFID卡内, 实验操作过程只需要按试剂准备过程准备好后, 将RFID卡与全自动设备适配即可完成从信息读取、加样到检测的全过程。

[0079] 实验例1

[0080] 本实施例为本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法(实施例2)、电化学发光法、胶体金免疫层析法、化学发光法, 对PCT试剂盒检测, 各检测方法与本发明的检测方法, 其结果对比见表1-2和图1-3。

[0081] 电化学发光法: 电化学发光法(ECLIA)发展90年代, 它在发光反应中加入了电化学反应, 是继放射免疫、酶联免疫、化学发光免疫测定后的新一代免疫测定技术, 是电化学和

免疫学相结合的产物。该技术敏感度高,线性范围宽;反应时间短,试剂稳定性好,但其需要仪器设备要求高。

[0082] 胶体金免疫层析法:胶体金免疫层析法是将纳米金标记技术与免疫层析技术相结合的一种快速免疫检测方法,具有操作简单快速的优点,但灵敏度低且定量不准确。

[0083] 化学发光法:化学发光免疫分析是将化学发光技术、免疫分析技术二者结合起来的一种新兴分析方法。该技术敏感、准确,可应用于全自动检测,但相应的标记物研发门槛高,需要昂贵的仪器且耗时较长。

[0084] 表1检测PCT试剂盒各检测方法的定量变异系数、测量范围和检测时间

	电化学发光测试结果	金磁微粒时间分辨免疫测试结果	胶体金免疫层析测试结果	化学发光测试结果
[0085] 定量变异系数 CV%	10%	10%	15%	10%
测量范围	0.02-100ng/ml	0.02-100 ng/ml	0.1-100 ng/ml	0.05-40 ng/ml
检测时间	15min	10min	10min	30min

[0086] 表2各检测方法临床样本测试对比结果

[0087]

样 本 编 号	电 化 学 发 光 测 试 结 果 (ng/ ml)	金 磁 微 粒 时 间 分 辨 测 试 结 果 (ng/ ml)	与 电 化 学 结 果 的 偏 差	胶 体 金 免 疫 层 析 测 试 结 果 (ng/ml)	与 电 化 学 结 果 的 偏 差	化 学 发 光 测 试 结 果 (ng/ml)	与 电 化 学 结 果 的 偏 差
1	<0.02	<0.02	-----	<0.1	-----	<0.05	-----
2	<0.02	<0.02	-----	<0.1	-----	<0.05	-----
3	0.55	0.56	4%	0.27	-50%	0.34	-38%
4	0.76	0.64	-15%	0.44	-42%	0.62	-18%
5	0.16	0.17	10%	0.21	33%	0.1	-37%
6	0.60	0.57	-4%	0.58	-3%	0.52	-13%
7	0.20	0.23	18%	0.37	89%	0.22	12%
8	0.20	0.23	13%	0.19	-6%	0.24	18%
9	0.45	0.50	11%	0.62	37%	0.35	-22%
10	0.34	0.31	-7%	0.22	-35%	0.42	25%
11	0.90	0.93	2%	0.68	-25%	1.03	14%
12	0.84	1.01	20%	0.61	-27%	0.69	-18%

[0088]

13	1.10	1.16	6%	1.36	24%	1.4	27%
14	3.22	2.86	-11%	2.07	-36%	1.08	-66%
15	1.64	1.35	-18%	1.88	15%	1.42	-13%
16	2.75	2.55	-7%	4.84	76%	2.6	-5%
17	4.31	4.91	14%	5.12	19%	6.9	60%
18	5.76	4.95	-14%	8.15	41%	6.43	12%
19	8.37	7.29	-13%	5.81	-31%	9.36	12%
20	5.34	4.55	-15%	4.14	-22%	7.39	38%
21	8.32	9.38	13%	6.07	-27%	6.04	-27%
22	6.14	6.20	1%	6.68	9%	0.93	-85%
23	27.97	30.88	10%	29.43	5%	18	-36%
24	27.59	22.90	-17%	24.28	-12%	29.66	8%
25	10.04	10.89	9%	15.59	55%	12.25	22%
26	11.83	13.81	17%	13.32	13%	11.2	-5%
27	27.49	28.92	5%	31.2	13%	22.45	-18%
28	21.26	17.48	-18%	19.5	-8%	22.18	4%
29	41.25	36.67	-11%	47.85	16%	>40	-----
30	20.97	24.03	15%	31.68	51%	>40	-----
31	35.55	34.68	-2%	41.02	15%	>40	-----
32	66.84	61.51	-8%	52.84	-21%	>40	-----
33	56.88	49.73	-13%	50.25	-12%	>40	-----
34	60.68	66.68	10%	43.62	-28%	>40	-----
35	64.25	52.50	-18%	54.13	-16%	>40	-----
36	61.38	64.69	5%	52.46	-15%	>40	-----
37	88.61	90.24	2%	98.23	11%	>40	-----
38	>100	>100	-----	>100	-----	>40	-----

[0089] 由表1可知,本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法(实施例2)、电化学发光法、胶体金免疫层析法、化学发光法,四种方法对比可知,本发明检测方法的定量变异系数CV%与电化学发光法、化学发光法均是10%;本发明检测方法的测量范围为0.02-100ng/ml,与电化学发光法相同,大于胶体金免疫层析法和化学发光法的测量范围;本发明检测方法的检测时间为10min,与胶体金免疫层析法相同,明显短于电化学发光法和化学发光法的检测时间。由此可见,本发明的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,同时满足了定量变异系数小、测量范围宽和检测时间短的优点。

[0090] 由表2可知,以电化学发光法作为对照,本发明的基于金磁微粒的时间分辨荧光免

疫检测方法,明显较于其余两种检测方法灵敏度及准确度要高。

[0091] 由图1可知,本发明的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法,与电化学发光法临床样本相关系数 $R=0.9915$ 。

[0092] 由图2可知,胶体金免疫层析法与电化学发光法临床样本相关系数 $R=0.9742$ 。

[0093] 由图3可知,磁微粒化学发光法与电化学发光法临床样本相关系数 $R=0.9566$ 。

[0094] 综上可知,本发明在检测范围、检测稳定性、快速检测等、临床样本相关性、测试准确度等方面具有很大的优势。

[0095] 实验例2

[0096] 本实验例是金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法与磁珠的时间分辨荧光免疫检测方法,进行对比的实验

[0097] 本发明提供金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法同实施例2,磁珠的时间分辨荧光免疫检测方法同专利(申请号:201811025038.9)中所述的检测方法。

[0098] 在时间分辨免疫分析法方法中,抗原抗体免疫复合物的形成需要一定的孵育反应时间,缩短反应时间,能提高检测的速度。本实验采用一步法作为反应模式,分别采用金磁微粒和磁珠作为固相载体,以一定浓度CRP标准品作为待测分析物,各自加入足量钕标记抗体,在不同的孵育时间(5、10、15、20、25、30min)下,37℃振荡孵育反应,结果如图4所示。

[0099] 由图4可以看出,荧光值强度随着孵育反应时间的增加而不断上升。固相载体为金磁微粒的,当孵育反应时间超过5min时,曲线趋于平衡,说明抗原抗体的免疫结合达到动态平衡,相较于固相载体为磁珠的,要孵育反应时间达到15min时,抗原抗体的免疫结合才到达动态平衡。因此金磁微粒作为固相载体,能缩短反应时间,提高检测速度。

[0100] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

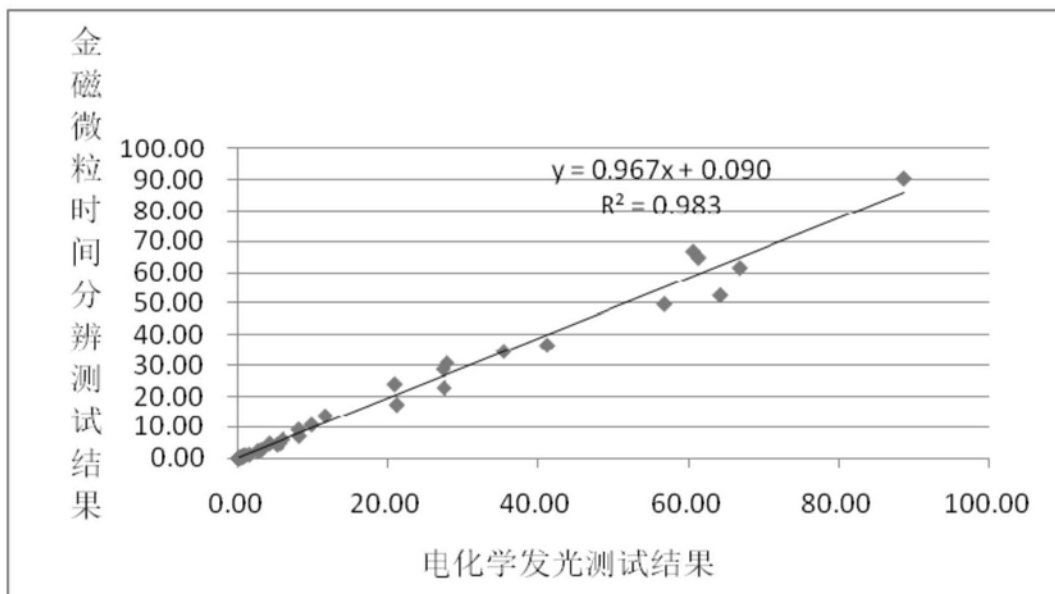


图1

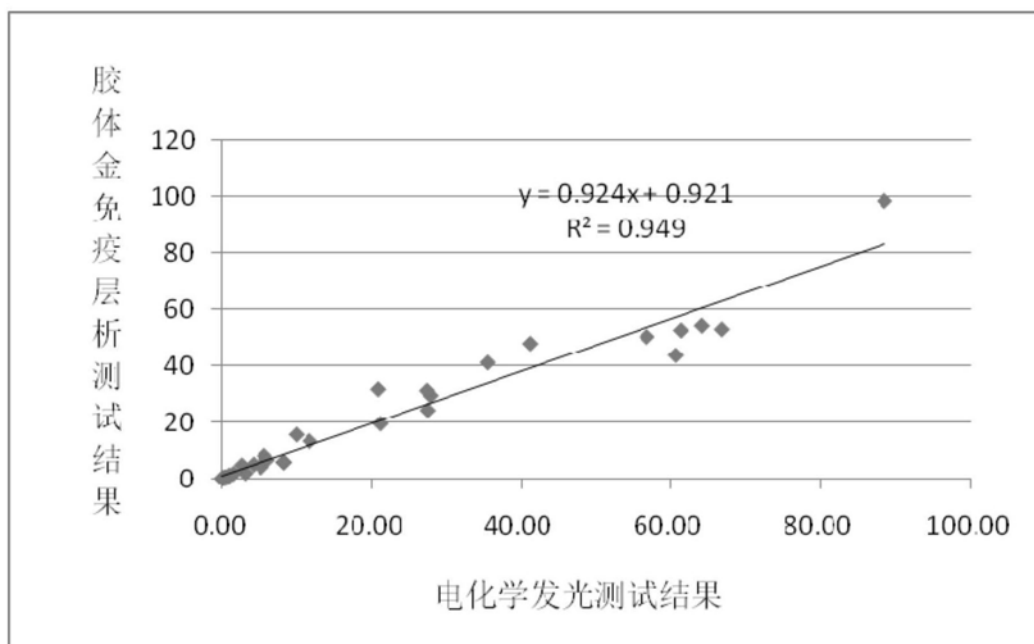


图2

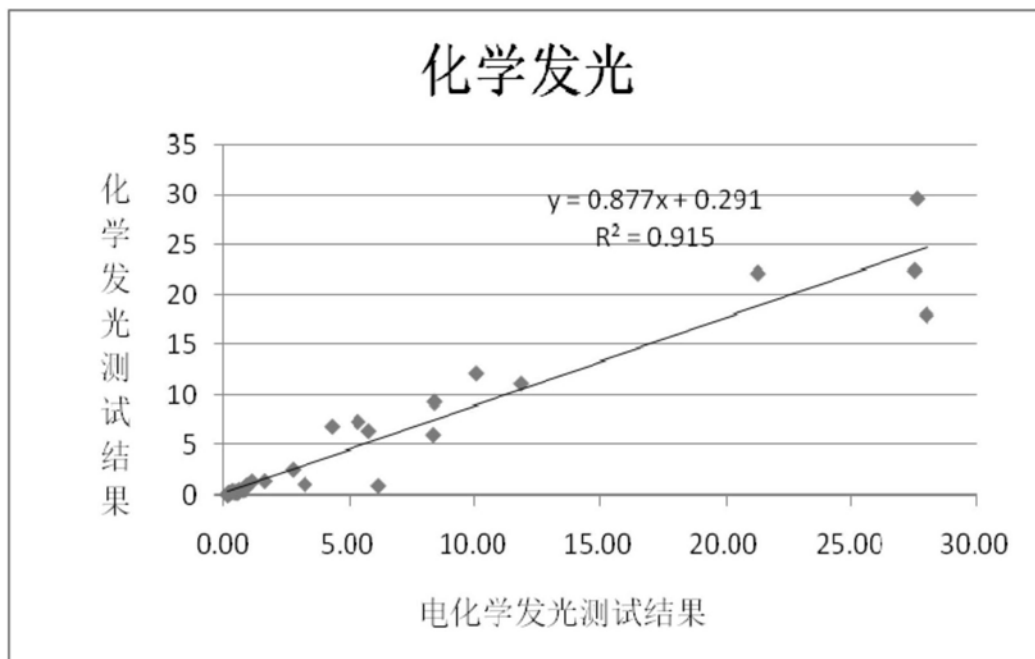


图3

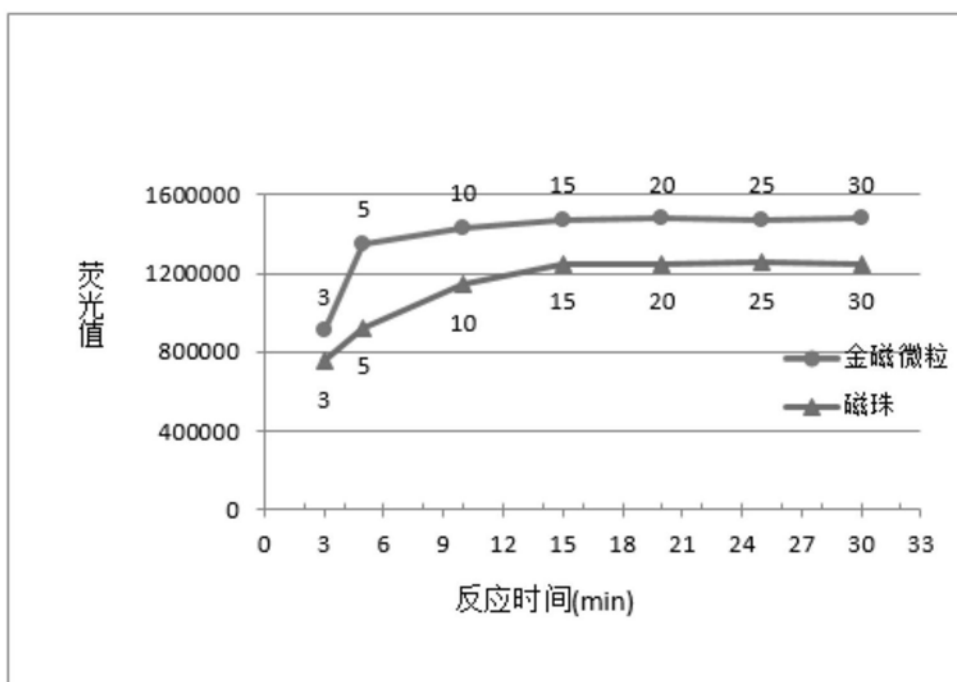


图4

专利名称(译)	一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN111024940A	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN201911422978.6	申请日	2019-12-31
[标]发明人	李根平 李爱霞		
发明人	李根平 庄雨璋 李爱霞		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/54326		
代理人(译)	颜希文		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法，属于免疫学检测领域。本发明提供基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法，包括免疫金磁微粒液的制备，用镧系元素螯合物标记抗原或抗体，获得荧光标记物，将待检测样品加入免疫金磁微粒液中，再荧光标记物，混匀孵育，然后洗涤金磁微粒，反应体系中加入荧光增强物，然后检测反应体系中标记物的荧光。本发明提供的基于金磁微粒的时间分辨荧光免疫检测方法，首次将金磁微粒包被生物原料技术用于时间分辨荧光检测，大大提高检测范围，缩短反应时间，提高灵敏度，金磁微粒可以和不同的探针分子结合，使检测同一样本中不同的待测物成为可能。

