



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106226513 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610627101.0

(22)申请日 2016.08.02

(71)申请人 北京乐普医疗科技有限责任公司

地址 102200 北京市昌平区超前路37号7-1
号楼

(72)发明人 张单单 胡飞 熊晶 邱笑违

余占江

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋 侯桂丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法及其应用

(57)摘要

本发明提供一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法,所述方法为:使磁珠偶联包被抗体,得到偶联包被抗体的磁珠溶液,而后偶联包被抗体的磁珠溶液与含有相关抗原的样本混合,通过特异性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合,而后加入荧光微球标记的抗体溶液,荧光微球标记的抗体与磁珠上的抗原发生特异性免疫反应,检测荧光信号得出抗原含量。本发明检测方法具有灵敏度高、特异性强等优点,还可以解决某些情况下某种抗体包被不牢固的问题。可用于抗原的快速检测,具有稳定性好、检测结果准确等特点。

1. 一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法,其特征在于,所述方法为:使磁珠偶联包被抗体,得到偶联包被抗体的磁珠溶液,而后偶联包被抗体的磁珠溶液与含有相关抗原的样本混合,通过特异性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合,而后加入荧光微球标记的抗体溶液,荧光微球标记的抗体与磁珠上的抗原发生特异性免疫反应,检测荧光信号得出抗原含量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述磁珠为羧基化、氨基化或环氧基化磁珠中的任意一种,优选羧基化磁珠;

优选地,所述磁珠粒径为20nm-5 μ m,优选为200nm-3 μ m。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,将磁珠偶联包被抗体之前,先将磁珠进行平衡和活化处理;

所述平衡处理为:将磁珠在平衡缓冲液中于多功能磁分离架下平衡2-3次;

优选地,所述平衡缓冲液为PBS缓冲液、MES缓冲液或水;

优选地,所述PBS缓冲液为0.01M-0.02M的PBS缓冲液,进一步优选0.01M、pH为6-7PBS缓冲液;

优选地,所述MES缓冲液为0.05M、pH为6-7的MES缓冲液。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述活化处理为:利用偶联剂溶液于多功能磁分离架下对平衡后的磁珠活化30-60min;

优选地,所述偶联剂为1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺、戊二醛、4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯、3-马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合,优选为基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺;

优选地,所述偶联剂在活化处理体系中的浓度为0.05-10mg/mL,优选为0.1-1mg/mL;

优选地,所述偶联剂溶液为将偶联剂溶解在0.05M、pH6-7的MES缓冲液或0.01M-0.02M、pH为6-7的PBS缓冲液中得到的溶液。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述将磁珠偶联包被抗体的方法为:

a、向活化后的磁珠缓冲液体系中加入抗体,室温下偶联2-4h,多功能磁分离架下缓冲液清洗2-3次;

b、加入封闭液封闭30-60min,多功能磁分离架下缓冲液清洗,重悬得到偶联包被抗体的磁珠溶液。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤a所述加入抗体使得抗体在体系中的浓度为0.1-1mg/mL,优选0.5-1mg/mL;

优选地,步骤a所述缓冲液为0.05M、pH6-7的MES缓冲液;

优选地,步骤b所述封闭液为牛血清白蛋白封闭液;

优选地,步骤b所述封闭液的终浓度为1-2%;

优选地,步骤b所述缓冲液为0.05M、pH6-7的MES缓冲液。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其特征在于,所述偶联包被抗体的磁珠溶液的浓度为0.2-1mg/mL,优选0.5mg/mL;

优选地,相对于10 μ L偶联包被抗体的磁珠溶液,所述含有相关抗原的样本的用量为15-100 μ L,优选20 μ L;

优选地,所述荧光微球标记的抗体溶液的浓度为0.1-1mg/mL,优选0.5mg/mL;

优选地,相对于10 μ L偶联包被抗体的磁珠溶液,所述荧光微球标记的抗体溶液的用量为1-3 μ L;

优选地,所述特异性免疫反应的时间为10-30min。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1)磁珠平衡和活化处理:将磁珠在平衡缓冲液中于多功能磁分离架下平衡2-3次,利用偶联剂溶液于多功能磁分离架下对平衡后的磁珠活化30-60min;

(2)将磁珠偶联包被抗体:向活化后的磁珠缓冲液体系中加入抗体,室温下偶联2-4h,多功能磁分离架下缓冲液清洗2-3次;加入封闭液封闭30-60min,多功能磁分离架下缓冲液清洗,重悬,得到偶联包被抗体的磁珠;

(3)抗原含量测定:将偶联包被抗体的磁珠溶液与含有相关抗原的样本、荧光微球标记的标记抗体混合,发生特异性免疫反应10-30min,反应结束后,反应液在多功能磁分离架下弃上清,复溶到原体积,用缓冲溶液清洗,而后检测荧光信号得出抗原含量。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述方法在抗原试纸条检测中的应用。

10. 根据权利要求1-8中任一项所述方法在微流控芯片检测中的应用。

一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法及其应用。

背景技术

[0002] 磁珠是一种磁性高且较稳定的磁性材料,具有粒径小、均一性高、悬浮稳定性好、超顺磁性等优点。其结构包括三部分:核心部分为磁性材料,应用最广泛的多为铁及其氧化物(Fe、Fe₃O₄、Fe₂O₃);核心外包裹一层高分子聚合物固相颗粒(如聚氯乙烯,聚苯乙烯,聚乙烯亚胺)作为载体;最外层是功能基团,如羟基(-COOH)、氨基(-NH₂)、醛基(-CHO)、羧基(-COOH)等,由于载体微球表现物理性质不同,可共价结合不同的免疫配基,如酶、细胞、抗体、抗原、DNA、RNA等生物活性物质。磁珠细小而均一,为功能基团和受体的反应提供了较大的接触面积;检测复杂的生物样本时受到颗粒性杂质等的影响较小;作为一种流动性的固相支持物,其洗涤和反应都进行的更加充分。因此磁珠广泛用于生物医学领域,如靶向载药、细胞分离、蛋白质分离纯化、核酸分离纯化、免疫检测等。

[0003] 磁珠常用的检测方法包括免疫团聚检测、光学检测等,这些方法具有不能实现定量检测、灵敏度低、需要大型专门检测仪器等缺点。荧光免疫层析技术由于具有高灵敏度、稳定性好、信号值高等优点,得到了快速的发展。

[0004] 因此,在本领域中,如何将磁珠与荧光免疫层析技术结合以得到一种灵敏度高可快速定量检测抗原含量的方法是本领域亟需解决的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法及其应用。

[0006] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一方面,本发明提供一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法,所述方法为:使磁珠偶联包被抗体,偶联包被抗体的磁珠与含有相关抗原的样本混合,通过特异性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合,而后加入荧光微球标记的抗体,荧光微球标记的抗体与磁珠上的抗原发生特异性免疫反应,检测荧光信号得出抗原含量。

[0008] 本发明利用双抗夹心法,即利用磁珠偶联包被抗体后与抗原特异性免疫反应,实现将抗原固定至磁珠上,而后在通过荧光标记的抗体与抗原的反应,以通过荧光信号值来检测抗原的含量。利用所述双抗夹心法实现了通过免疫磁珠与荧光微球相结合来完成样品中抗原的定量检测,灵敏度高、稳定性好、信号值高,无需大型专门检测仪器。

[0009] 优选地,所述磁珠为羧基化、氨基化或环氧基化磁珠中的任意一种,优选羧基化磁珠。

[0010] 优选地,所述磁珠粒径为200nm-3 μ m,例如200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1 μ m、1.2 μ m、1.5 μ m、2 μ m、3 μ m优选为200nm-1 μ m。

[0011] 特定包被基团的生物磁珠对特定物质起吸附作用,但是也会不可避免的吸附少量

的杂质。较大粒径的生物磁珠具有很大的比表面积,理论上能够更好地吸附目标物质,但是也会吸附更多的杂质,影响到后续的实验。所以在本发明中选择磁珠粒径优选为200nm-1 μ m。

[0012] 优选地,将磁珠偶联包被抗体之前,先将磁珠进行平衡和活化处理。

[0013] 优选地,所述平衡处理为:将磁珠在平衡缓冲液中于多功能磁分离架下平衡2-3次。

[0014] 优选地,所述平衡缓冲液为PBS缓冲液、MES缓冲液或水。

[0015] 优选地,所述PBS缓冲液为0.01M-0.02M(例如0.01M、0.012M、0.014M、0.016M、0.018M或0.02M)、pH为6-7(例如6、6.2、6.4、6.6、6.8或7)的PBS缓冲液,进一步优选0.01M、pH为6-7PBS缓冲液。

[0016] 优选地,所述MES缓冲液为0.05M、pH为6-7(例如6、6.2、6.4、6.6、6.8或7)的MES缓冲液。

[0017] 优选地,所述活化处理为:利用偶联剂溶液于多功能磁分离架下对平衡后的磁珠活化30-60min,例如30min、33min、35min、38min、40min、42min、45min、48min、50min、53min、55min、58min或60min。

[0018] 优选地,所述偶联剂为1-乙基-3-(3-二甲氨丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺、戊二醛、4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯、3-马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合,优选为基-3-(3-二甲氨丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)。

[0019] 优选地,所述偶联剂在活化处理体系中的浓度为0.05-10mg/mL,例如0.06mg/mL、0.08mg/mL、0.1mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL、0.8mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL或9mg/mL,优选为0.1-1mg/mL。

[0020] 优选地,所述偶联剂溶液为将偶联剂溶解在0.05M、pH6-7的MES缓冲液或0.01M-0.02M、pH为6-7的PBS缓冲液中得到的溶液。

[0021] 在所述活化处理后利用0.05M、pH6-7的MES缓冲液或0.01M-0.02M、pH为6-7的PBS缓冲液清洗活化后的磁珠2-3次。

[0022] 优选地,所述将磁珠偶联包被抗体的方法为:

[0023] a、向活化后的磁珠缓冲液体系中加入抗体,室温下偶联2-4h,多功能磁分离架下缓冲液清洗2-3次;

[0024] b、加入封闭液封闭30-60min,多功能磁分离架下缓冲液清洗,重悬得到偶联包被抗体的磁珠。

[0025] 优选地,步骤a所述加入抗体使得抗体在体系中的浓度为0.1-1mg/mL,例如0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL或1mg/mL,优选0.5-1mg/mL。

[0026] 优选地,步骤a所述缓冲液为0.05M、pH6-7(例如6、6.2、6.4、6.6、6.8或7)的MES缓冲液。

[0027] 步骤a所述偶联时间为2-4h,例如2h、2.2h、2.4h、2.6h、2.8h、3h、3.2h、3.4h、3.6h、3.8h或4h。

[0028] 优选地,步骤b所述封闭液为牛血清白蛋白(BSA)封闭液。

[0029] 优选地,步骤b所述封闭液的终浓度为1-2%,例如1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%或2%;所述终浓度是指加入至体系后的最终浓度。

[0030] 优选地,步骤b所述缓冲液为0.05M、pH6-7(例如6、6.2、6.4、6.6、6.8或7)的MES缓冲液。

[0031] 优选地,所述偶联包被抗体的磁珠溶液的浓度为0.2-1mg/mL,例如、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL或1mg/mL优选0.5mg/mL。

[0032] 优选地,相对于10 μ L偶联包被抗体的磁珠溶液,所述含有相关抗原的样本的用量为15-100 μ L,例如15 μ L、20 μ L、25 μ L、30 μ L、50 μ L、75 μ L或100 μ L,优选20 μ L。

[0033] 优选地,所述荧光微球标记的抗体溶液的浓度为0.1-1mg/mL,例如0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL或1mg/mL,优选0.5mg/mL。

[0034] 在本发明中,所述荧光微球标记的抗体溶液为荧光微球标记的抗体的缓冲溶液体系,所述缓冲溶液为上文提到的缓冲溶液。

[0035] 优选地,相对于10 μ L偶联包被抗体的磁珠溶液,所述荧光微球标记的抗体溶液的用量为1-3 μ L,例如1 μ L、1.2 μ L、1.4 μ L、1.6 μ L、1.8 μ L、2 μ L、2.3 μ L、2.5 μ L、2.8 μ L或3 μ L。

[0036] 优选地,所述特异性免疫反应的时间为10-30min,例如10min、12min、15min、18min、20min、23min、25min、28min或30min。

[0037] 作为本发明的优选技术方案,所述免疫磁珠定量检测相关抗原的方法包括以下步骤:

[0038] (1)磁珠平衡和活化处理:将磁珠在平衡缓冲液中于多功能磁分离架下平衡2-3次,利用偶联剂溶液于多功能磁分离架下对平衡后的磁珠活化30-60min;

[0039] (2)将磁珠偶联包被抗体:向活化后的磁珠缓冲液体系中加入抗体,室温下偶联2-4h,多功能磁分离架下缓冲液清洗2-3次;加入封闭液封闭30-60min,多功能磁分离架下缓冲液清洗,重悬,得到偶联包被抗体的磁珠;

[0040] (3)抗原含量测定:将偶联包被抗体的磁珠溶液与含有相关抗原的样本、荧光微球标记的标记抗体混合,发生特异性免疫反应10-30min,反应结束后,反应液在多功能磁分离架下弃上清,复溶到原体积,用缓冲溶液清洗,而后检测荧光信号得出抗原含量。

[0041] 在本发明中,所述特异性免疫反应可以在旋转混合仪中进行。反应结束后,可以将反应液在多功能磁分离架下弃上清,复溶到原体积,用缓冲溶液(例如0.01M、pH为6PBS缓冲液)清洗,其目的是消除没有发生特异性免疫反应的荧光标记抗体对抗原含量测定结果的影响。

[0042] 另一方面,本发明提供了所述免疫磁珠定量检测相关抗原的方法在抗原试纸条检测中的应用。在该应用中将偶联包被抗体的磁珠分别置于磁珠结合垫的C、T检测线上,磁珠结合垫前端是样品垫,后端是吸水垫,含有相关抗原的样本从样品垫加样,在荧光标记抗体固定处混合,层析后用荧光定量分析仪(例如Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪)检测荧光信号,得出抗原含量。

[0043] 另一方面,本发明提供了所述免疫磁珠定量检测相关抗原的方法在微流控芯片检

测中的应用。在该应用中,将偶联包被抗体的磁珠置于微流控芯片通道的特定位置,芯片下置一强磁铁固定磁珠在通道中的位置,含有相关抗原的样本加样,在荧光标记抗体固定处混合,层析完全后用荧光定量分析仪(例如Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪)检测荧光信号,得出抗原含量。

[0044] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0045] 本发明通过对不同粒径的磁珠进行不同条件的处理得到一种较高效率的制备免疫磁珠的方法,此免疫磁珠结合高灵敏度的荧光微球标记的标记抗体通过双抗夹心法的特异免疫反应检测抗原含量。本发明检测方法结合了磁珠稳定性好、易固定以及荧光微球灵敏度高等优点,可以解决某些情况或者某种抗体包被不牢固的问题。可用于抗原的快速检测,具有稳定性好、检测结果准确等特点。

具体实施方式

[0046] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0047] 实施例1

[0048] 在本实施例中,利用免疫磁珠检测D-Dimer二聚体具体包括以下步骤:

[0049] (1)选用粒径为3 μ m的羧基化微球,用0.01M、pH 6的PBS缓冲液平衡磁珠;加入EDC/NHS(0.01M、pH为6的PBS缓冲液配置),使其在体系中的浓度为1mg/mL,活化60min,多功能磁分离架下0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗2-3次;

[0050] (2)向活化后的磁珠缓冲液(0.05M、pH7的MES缓冲液)体系中加入D-Dimer包被抗体,使其在体系中的浓度为0.5mg/mL,室温下偶联4h,多功能磁分离架下0.05M、pH 6的MES缓冲液清洗2-3次;加入浓度1%的封闭液BSA,室温下封闭40min,多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗,重悬,得到偶联包被抗体的磁珠;

[0051] (3)将偶联包被抗体的磁珠溶液与含有一定浓度相关抗原的样本混合,通过特异性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合,而后加入荧光微球标记的D-Dimer标记抗体D-02,10min后在多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗,重悬,用Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪检测荧光信号。结果如表1所示。

[0052] 表1

D-Dimer 抗原浓度 (ng/ml)	500	1000	2000	4000
检出值 1	530.65	1139.32	1925.67	3803.27
检出值 2	538.14	916.84	1883.18	4368.43
检出值 3	499.59	944.7	1802.75	4187.32
检出值 4	537.79	1192.51	2082.53	4296.49
检出值 5	522.82	1026.56	1789.48	4238.27
平均值	525.80	1043.99	1896.72	4178.76
标准差	18.30	137.96	117.62	251.67
变异系数	3.48%	13.21%	6.20%	6.02%
线性相关性 R^2	0.9982			

[0055] 结果显示,利用此方法检测D-Dimer二聚体抗原的CV在15%以内,线性相关性高达0.998,重复试验结果一致,说明此法具有比较高的稳定性、准确性。

[0056] 实施例2

[0057] 在本实施例中,利用免疫磁珠检测D-Dimer二聚体抗原具体包括以下步骤:

[0058] (1)选用粒径为1 μ m的羧基化磁珠,用0.01M、pH 7的PBS缓冲液平衡磁珠2-3次;加入EDC/NHS(0.01M、pH为7的PBS缓冲液配置),使其在体系中的浓度为0.5mg/mL,活化40min,多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗2-3次,得到活化后的磁珠;

[0059] (2)向活化后的磁珠缓冲液(0.05M、pH7的MES缓冲液)体系中加入D-Dimer包被抗体,使其在体系中的浓度为1mg/mL,室温下偶联2h,多功能磁分离架下用0.05M、pH6的MES缓冲液清洗2-3次;加入浓度1%的封闭液BSA,室温下封闭60min,多功能磁分离架下用0.01M、pH为7PBS缓冲液清洗,重悬,得到偶联包被抗体的磁珠;

[0060] (3)将偶联包被抗体的磁珠溶液与含有一定浓度相关抗原的样本混合,通过特异性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合,而后加入荧光微球标记的D-Dimer标记抗体D-02,10min后在多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗,重悬,用Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪检测荧光信号,结果如表2所示。

[0061] 表2

D-Dimer 抗原浓	500	1000	2000	4000
度 (ng/ml)				
检出值 1	498.24	983.11	1998.55	4127.69
检出值 2	520.69	962.15	2039.7	4340.39
检出值 3	498.92	1017.79	2061.74	3805.45
检出值 4	516.86	932.34	2062.36	3964.32
检出值 5	483.8	936.74	1988.96	4236.11
平均值	503.70	966.43	2030.26	4094.79
标准差	11.77	35.95	29.94	228.87
变异系数	2.34%	3.72%	1.47%	5.59%
线性相关性 R ²	0.9999			

[0064] 结果显示,利用此方法检测D-Dimer二聚体抗原的CV在10%以内,线性相关性高达0.9999,重复试验结果一致,说明此法具有很高的稳定性、准确性。

[0065] 实施例3

[0066] 在本实施例中,利用免疫磁珠检测相关抗原具体包括以下步骤:

[0067] (1)选用粒径为200nm的羧基化磁珠,用0.02M、pH 6的PBS缓冲液平衡磁珠2-3次;加入EDC/NHS(0.02M、pH为6的PBS缓冲液配置),使其在体系中的浓度为0.1mg/mL,活化30min,多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗2-3次,得到活化后的磁珠;

[0068] (2)向活化后的磁珠缓冲液(0.05M、pH6的MES缓冲液)体系中加入D-Dimer包被抗体,使其在体系中的浓度为0.1mg/mL,室温下偶联4h,多功能磁分离架下用0.05M、pH6的MES缓冲液清洗2-3次;加入浓度1%的封闭液BSA,室温下封闭40min,多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗,重悬,得到偶联包被抗体的磁珠;

[0069] (5)将偶联包被抗体的磁珠溶液与含有一定浓度相关抗原的样本混合,通过特异

性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合,而后加入荧光微球标记的D-Dimer标记抗体D-02,10min后在多功能磁分离架下用0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗,重悬,用Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪检测荧光信号,结果如表3所示。

[0070] 表3

D-Dimer 抗原浓度 (ng/ml)	500	1000	2000	4000
检出值 1	534.96	897.42	1759.39	3762.17
检出值 2	533.57	825.75	1784.78	3831.42
检出值 3	519.03	827.67	1995.37	4042.99
[0071] 检出值 4	459.62	862.96	2097.07	4088.38
检出值 5	492.09	996.25	1703.99	3988.71
平均值	507.85	882.01	1868.12	3942.73
标准差	35.52	33.94	163.96	158.88
变异系数	6.99%	3.85%	8.78%	4.03%
线性相关性 R^2	0.9992			

[0072] 结果显示,利用此方法检测D-Dimer二聚体抗原的CV在10%以内,线性相关性高达0.9992,重复试验结果一致,说明此法具有很高的稳定性、准确性。

[0073] 实施例4

[0074] 在本实施例中,结合免疫侧向层析技术利用免疫磁珠定量检测相关抗原,具体包括以下步骤:

[0075] (1)选用粒径为1 μ m的羧基化微球,用0.01M、pH 6的PBS缓冲液平衡磁珠;

[0076] (2)加入终浓度为0.5mg/ml的EDC和NHS(0.01M、pH为6的PBS缓冲液配置),活化60min,多功能磁分离架下0.01M、pH为6PBS缓冲液清洗2-3次;

[0077] (3)分别加入终浓度0.5mg/ml的D-Dimer包被抗体D-01和羊抗鼠二抗(0.05M,pH6-7的MES缓冲液),室温下偶联2-4个小时,多功能磁分离架下0.05M,pH6-7的MES缓冲液清洗2-3次;

[0078] (4)将制备好的免疫磁珠分别置于磁珠结合垫C、T检测线上,磁珠结合垫前端是样品垫,后端是吸水垫,含有相关抗原的样本与荧光微球标记的D-Dimer标记抗体D-02混合,从样品垫加样,层析10-15min,用Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪检测荧光信号,结果如表4所示。

[0079] 表4

D-Dimer 抗原浓度 (ng/ml)	500	1000	2000	4000
检出值 1	466.36	1043.33	1932.65	3410.16
检出值 2	458.43	920.38	2040.11	3769.08
检出值 3	498.17	1003.74	1931.6	3483.34
检出值 4	527.59	815.28	1979.14	3592.83
检出值 5	459.48	875.18	2241.68	3984.37
平均值	482.01	931.58	2025.04	3647.96
标准差	31.69	100.91	51.20	156.06
变异系数	6.57%	10.83%	2.53%	4.28%
线性相关性 R^2	0.9978			

[0081] 结果显示,利用此方法检测D-Dimer二聚体抗原的CV在15%以内,线性相关性高达0.9978,重复试验结果一致,说明此法结合免疫侧向层析也具有很高的稳定性、准确性。

[0082] 实施例5

[0083] 在本实施例中,结合微流控技术利用免疫磁珠定量检测相关抗原,具体包括以下步骤:

[0084] (1)选用粒径为1 μ m的羧基化微球,用MES缓冲液(0.05M、pH为6)平衡磁珠;

[0085] (2)加入终浓度为1mg/ml的EDC和NHS(0.05M,pH 6的MES缓冲液),活化45min,多功能磁分离架下0.05M,pH6的MES缓冲液清洗2-3次;

[0086] (3)加入终浓度0.5mg/ml的抗体(0.05M,pH6的MES缓冲液),室温下偶联2-4个小时,多功能磁分离架下0.05M,pH6的MES缓冲液清洗2-3次;

[0087] (4)将制备好的免疫磁珠置于微流控芯片通道的特定位置,芯片下置一强磁铁固定磁珠在通道中的位置,含有相关抗原的样本与荧光微球标记的标记抗体混合加样,层析后用Lepu Quant-Fluo 800荧光定量分析仪检测。解决了此种情况下抗体在芯片中不能包被或者包被效率低的问题。荧光信号检测结果如表5所示。

[0088] 表5

D-Dimer 抗原浓度 (ng/ml)	500	1000	2000	4000
检出值 1	467.73	868.38	2291.32	3417.03
检出值 2	546.34	815.95	2190.1	4052.51
检出值 3	506.5	935.22	2228.56	3393.2
检出值 4	491.98	975.61	2106.48	3392.73
检出值 5	459.32	831.13	2389.44	3341.38
平均值	494.37	885.26	2241.18	3519.37
标准差	32.94	70.75	77.31	325.96
变异系数	6.66%	7.99%	3.45%	9.26%
线性相关性 R^2	0.9857			

[0090] 结果显示,利用此方法检测D-Dimer二聚体抗原的CV在10%以内,线性相关性为0.9857,重复试验结果一致,说明此法结合微流控技术也具有很高的稳定性、准确性。

[0091] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局

限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

专利名称(译)	一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法及其应用		
公开(公告)号	CN106226513A	公开(公告)日	2016-12-14
申请号	CN201610627101.0	申请日	2016-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
[标]发明人	张单单 胡飞 熊晶 邱笑违 余占江		
发明人	张单单 胡飞 熊晶 邱笑违 余占江		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种免疫磁珠定量检测相关抗原的方法，所述方法为：使磁珠偶联包被抗体，得到偶联包被抗体的磁珠溶液，而后偶联包被抗体的磁珠溶液与含有相关抗原的样本混合，通过特异性免疫反应抗原与磁珠上偶联的抗体结合，而后加入荧光微球标记的抗体溶液，荧光微球标记的抗体与磁珠上的抗原发生特异性免疫反应，检测荧光信号得出抗原含量。本发明检测方法具有灵敏度高、特异性强等优点，还可以解决某些情况下某种抗体包被不牢固的问题。可用于抗原的快速检测，具有稳定性好、检测结果准确等特点。

D-Dimer 抗原浓度 (ng/ml)	500	1000	2000	4000
检出值 1	530.65	1139.32	1925.67	3803.27
检出值 2	538.14	916.84	1883.18	4368.43
检出值 3	499.59	944.7	1802.75	4187.32
检出值 4	537.79	1192.51	2082.53	4296.49
检出值 5	522.82	1026.56	1789.48	4238.27
平均值	525.80	1043.99	1896.72	4178.76
标准差	18.30	137.96	117.62	251.67