



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108333343 A

(43)申请公布日 2018.07.27

(21)申请号 201710045387.6

(22)申请日 2017.01.19

(71)申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518019 广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路16号

(72)发明人 饶微 刘坤 袁锦云 刘来壮
李婷华 陈曙光

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 赵囡囡 金田蕴

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书3页 说明书32页

(54)发明名称

免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用

(57)摘要

本发明公开了一种免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用。其中,该免疫磁性复合物包括:采用氨基聚合物修饰磁性微球得到的氨基功能化的磁性微球;凝集素,凝集素与氨基聚合物连接。应用本发明的技术方案,凝集素实际上是通过包被在磁性微球表面的氨基聚合物介导连接在磁性微球上,氨基聚合物包被磁性微球使得磁球表面修饰上大量氨基基团,该外层聚合物具有树枝网络状结构,能够充分提高偶联载量,同时降低空间位阻,并且使得目标偶联物凝集素远离磁性微球的刚性表面,最大程度地保证了目标偶联物的生物活性。

1. 一种免疫磁性复合物,其特征在于,包括:

采用氨基聚合物修饰磁性微球得到的氨基功能化的磁性微球;凝集素,所述凝集素与所述氨基聚合物连接。

2. 根据权利要求1所述的免疫磁性复合物,其特征在于,所述凝集素为氧化凝集素;

优选的,所述氧化凝集素与所述氨基聚合物上氨基连接;

优选的,所述凝集素为羟基氧化成醛基的氧化凝集素,所述氧化凝集素通过醛基与所述氨基聚合物上氨基连接。

3. 根据权利要求1所述的免疫磁性复合物,其特征在于,所述氨基聚合物为聚乙烯亚胺、聚酰胺、聚丙烯酰胺或聚邻苯二胺,优选为聚乙烯亚胺。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫磁性复合物,其特征在于,所述免疫磁性复合物为用于捕获分离AFP-L3的免疫磁性复合物,优选的,所述凝集素为扁豆凝集素、小兵豆凝集素或刀豆凝集素,更优选为扁豆凝集素。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫磁性复合物,其特征在于,所述磁性微球包括磁球本体,所述磁球本体通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团;

优选的,所述活性基团包括羧基、羟基和氨基中的至少一种;

优选的,所述磁球本体为 Fe_2O_3 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,或者为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体;

优选的,所述磁球本体粒径为 $0.1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$;

优选的,所述氨基聚合物通过与所述活性基团反应得到所述氨基功能化的磁性微球。

6. 一种如权利要求1至5中任一项所述的免疫磁性复合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 采用氨基聚合物修饰磁性微球,得到氨基功能化的磁性微球;

2) 将凝集素与所述氨基聚合物连接形成所述免疫磁性复合物。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,在所述凝集素与所述氨基聚合物连接之前,还包括对所述凝集素进行氧化的步骤,得到氧化凝集素;

优选的,所述氧化凝集素与所述氨基聚合物上氨基连接;

优选的,将所述凝集素中的羟基氧化成醛基,得到氧化凝集素,所述氧化凝集素通过醛基与所述氨基聚合物上氨基连接。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述氧化步骤中采用的氧化剂为高碘酸盐、高氯酸盐或高锰酸盐,优选的,所述氧化剂为高碘酸钠、高氯酸钠或高锰酸钾,更优选为高碘酸钠;

优选的,所述氧化步骤中所述凝集素与所述氧化剂的质量浓度比为1:50-1:500;

优选的,所述氧化的反应温度为 $20\sim 30^\circ\text{C}$,反应时间为1-4小时;

优选的,所述凝集素的浓度为 $1\text{mg/mL}\sim 5\text{mg/mL}$ 。

9. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)具体包括:

11) 采用活化剂对所述磁性微球进行活化;

12) 将活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液进行反应;

13) 分离出表面修饰有氨基聚合物的磁性微球,用封闭剂进行反应,得到氨基功能化的磁性微球;

优选的,所述活化剂为二环己基碳二亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N,N'-二异丙基碳二亚胺中的至少一种;

优选的,所述磁性微球与所述活化剂的质量浓度比为:2:1-4:1;

优选的,所述活化的反应温度为37℃-40℃,反应时间为1h-4h;

优选的,所述步骤12)具体包括:将活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液,超声处理后,进行旋转混匀反应;

优选的,所述氨基聚合物水溶液中氨基聚合物的浓度为10mg/mL-200mg/mL;

优选的,所述活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液进行反应时,所述磁性微球的浓度为10mg/mL-20mg/mL;

优选的,所述封闭剂为乙醇胺、BSA或明胶,所述封闭剂的浓度为0.5-1mol/L。

10. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述步骤2)具体包括:将所述氨基功能化的磁性微球用重悬液重悬,然后加入所述氧化凝集素,混合后加入还原剂搅拌反应,除去上清洗涤后得到所述免疫磁性复合物;

优选的,所述重悬液为碳酸氢钠水溶液、Tris-HCl缓冲液或硼酸盐缓冲液,所述重悬液的浓度为0.05mol/L-0.2mol/L,pH为8-10;

优选的,所述还原剂为硼氢化钠、硼氢化钾或四氢铝锂,更优选为硼氢化钠,所述还原剂的浓度为1mg/mL-5mg/mL,更优选为5mg/mL;

优选的,所述氧化凝集素与所述氨基功能化的磁性微球的质量浓度比例为1:50-1:100;

优选的,所述步骤2)的反应温度为20℃-30℃,反应时间为2h-6h。

11. 一种如权利要求1至5中任一项所述的免疫磁性复合物的活性保存液,其特征在于,包括:稀释液组分、金属结合位点组分、金属螯合剂组分和生物防腐剂组分;

优选的,所述稀释液组分为磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液或碳酸盐缓冲液,所述稀释液的浓度为0.01-0.2mol/L,pH为7-9;

优选的,所述金属结合位点组分包括锰离子和钙离子,所述金属结合位点组分的浓度为0.5-5mmol/L,其中锰离子浓度为0.1-1mmol/L,钙离子浓度0.5-5mmol/L;

优选的,所述金属结合位点组分为氯化钙、硝酸钙、溴化钙、氯化锰、硫酸锰和硝酸锰中的至少两种;

优选的,所述金属螯合剂组分为乙二胺四乙酸、乙二胺四乙酸四钠、乙二胺四乙酸二钾和乙二胺四乙酸二钠中的至少一种;其中,所述金属螯合剂的工作浓度为0.05-0.2mg/mL;

优选的,所述生物防腐剂组分包括异噻唑啉酮、ε-多聚赖氨酸、叠氮钠、硫柳汞和庆大霉素中的至少一种,所述生物防腐剂组分的工作浓度为0.5mg/mL-2mg/mL。

12. 根据权利要求11所述的活性保存液,其特征在于,

所述活性保存液还包括表面活性剂组分;

优选的,所述表面活性剂组分为聚乙二醇、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯-20和辛基苯基聚氧乙烯醚中的至少一种,所述表面活性剂组分的工作浓度为0.1mg/mL-0.5mg/mL;

优选的,所述活性保存液还包括非蛋白类位点封闭剂;

优选的,所述非蛋白类位点封闭剂为明胶、鱼皮胶和乙醇胺中的至少一种,所述非蛋白类位点封闭剂的工作浓度为0.5g/mL-2g/mL。

13. 一种用于捕获分离和定量检测AFP-L3的抗原捕获剂,其特征在于,包括如权利要求1至5中任一项所述的免疫磁性复合物和如权利要求11或12所述的活性保存液。

14. 根据权利要求13所述的抗原捕获剂,其特征在于,以所述磁性微球的浓度计所述免疫磁性复合物在所述活性保存液中的浓度为0.5-2mg/mL。

15. 一种用于捕获分离和定量检测AFP-L3的试剂盒,其特征在于,包括如权利要求13或14所述的抗原捕获剂。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其特征在于,进一步包括:低浓度校准品、高度校准品、发光标记物标记的抗AFP抗体和缓冲液;

优选的,所述低浓度校准品浓度为10.936IU/mL-20.313IU/mL,所述高度校准品浓度为350IU/mL-650IU/mL;

优选的,发光标记物的工作浓度为5ng/mL-500ng/mL,所述抗AFP抗体的工作浓度为50ng/mL-5000ng/mL;

优选的,所述缓冲液为碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液;

优选的,所述发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物;碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吖啶酯及其衍生物或三联吡啶钌。

17. 一种如权利要求1至5中任一项所述的免疫磁性复合物、如权利要求13或14所述的抗原捕获剂、如权利要求15或16所述的试剂盒在捕获分离和定量检测AFP-L3中的应用。

18. 根据权利要求17所述的应用,其特征在于,所述的免疫磁性复合物、所述的抗原捕获剂或试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

19. 一种捕获分离和定量检测AFP-L3的系统,其特征在于,包括如权利要求15或16所述的试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体而言,涉及一种免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用。

背景技术

[0002] 原发性肝癌(primary hepatic carcinoma,PHC)是一种常见的恶性肿瘤,病死率在所有肿瘤中居第三位,仅次于肺癌和胃癌,我国每年死于肝癌的人数占世界死亡人数的45%。近年来,普遍认为PHC的发生是多因素、多途径、多步骤长期作用的结果,包括外环境致癌因素(寄生虫、细菌、病毒的感染、黄曲霉毒素的摄入、水源污染以及吸烟、饮酒)和自身遗传因素。由于PHC发病隐匿、进展迅速、治疗困难、致死率高,因此对PHC的早期诊断尤为重要。

[0003] 目前,对PHC的诊断常用的血清标志物主要是甲胎蛋白。甲胎蛋白(AFP)是一种分子量约69Kda的单链糖蛋白,其已被广泛用于PHC的普查、诊断、判断治疗效果和预测复发。但是,检测AFP来诊断PHC存在特异性不足和灵敏度低的问题,会造成假阳性和假阴性。有些良性肝病、消化和生殖系统的恶性肿瘤的AFP也会有所升高,有的肝癌AFP却可能保持低水平。早在70年代,研究人员发现在对AFP进行凝集素亲和电泳分析时,AFP存在不同的迁移率,电泳分成三条带,依次命名为AFP-L1、AFP-L2和AFP-L3,其中AFP-L1来自良性肝病,AFP-L2来自孕妇,AFP-L3源自肝癌细胞分泌。AFP异质体(AFP-L3)在PHC诊断与鉴别诊断中其敏感性与特异性均优于AFP,被作为新一代肝癌标志物。美国FDA于2005年批准该指标应用于肝癌预警,并把AFP-L3/AFP诊断肝癌的阳性界定值定为10%。AFP-L3/AFP被公认是比单纯的AFP-L3更为特异的PHC指标。

[0004] 临床上检测AFP-L3通常是根据不同类型的AFP与植物凝集素的结合能力不同而进行分离,然后应用免疫学的方法进行定量检测。常用的分离检测方法主要有亲和免疫交叉电泳技术、亲和印迹法、LiBASys自动分析系统检测法、“双位点夹心”酶联免疫吸附法、微流控芯片捕获法、亲和层析法和磁性微球捕获法等。其中,亲和免疫交叉电泳技术曾经是最常用方法之一,其染色方法有考马斯亮蓝法、放射自显影法、金银染色法、酶标法,该技术方法简单,但具有操作复杂、干扰因素多、灵敏度差等缺点,目前仅在实验室有少量应用;亲和印迹法具有重复性好、耗时短等优点,但由于操作复杂、耗时耗力,限制了其在临床上的应用;LiBASys自动分析系统检测法具有方便、快捷、操作简单等优点,但由于其设备昂贵、灵敏度低,也限制了该技术在临床上的应用;微流控芯片捕获法灵敏度高,但尚未广泛应用;亲和层析法基于糖捕获的原理,因方法简单、无需特殊设备、重复性好,现已被北京热景生物技术有限公司开发成微量离心柱提取试剂盒,是目前国内唯一获得药监局批准适用于AFP-L3分离纯化的方法,在国内外已开始广泛应用。

[0005] 近年来,随着磁性微球分离技术在免疫诊断领域的广泛应用,研发人员开始致力于利用磁性微球偶联植物凝集素来进行AFP-L3的分离,再利用已有的全自动化学发光检测

总AFP的试剂盒来检测分离得到的APF-L3,一定程度上提高了AFP-L3分离检测的自动化程度和检测效率。然而该方法利用碳二亚胺法将磁性微球与植物凝集素通过酰胺键偶联起来,使得植物凝集素直接与磁性微球的刚性界面直接接触,偶联率较低的同时也对植物凝集素的活性中心形成了空间位阻,降低了植物凝集素捕获AFP-L3的效率。

[0006] 下面举例说明现有技术中关于甲胎蛋白异质体的分离的技术方案。

[0007] 例1,摘自专利CN104714026A:一种甲胎蛋白异质体的分离检测组合物,系统及其应用,其涉及一种甲胎蛋白异质体的分离检测组合物,包括分离试剂和检测试剂,以及甲胎蛋白异质体的分离检测系统和应用,同时还涉及了一种甲胎蛋白异质体的分离检测试剂盒,通过本发明提供的一种甲胎蛋白异质体的分离检测组合物、系统及其应用,可以提示早期原发性肝癌,具有极高的灵敏度,方法快速简便而且自动化。其中,分离试剂包括偶联凝集素的磁性颗粒和洗脱液,偶联凝集素的磁性颗粒用于与待检测样品中的AFP-L3特异性结合;检测试剂包括包被甲胎蛋白抗体的磁性颗粒、标记酶的抗甲胎蛋白抗体。

[0008] 例2,摘自专利CN102879567B:用于肝癌诊断的甲胎蛋白异质体分离试剂盒及其组成试剂与应用,涉及一种用于肝癌诊断的甲胎蛋白异质体分离试剂盒及其组成试剂与应用。在优选实施方式中,成功的获得了均一、稳定的保护液,并通过对试剂盒的优化,获得了具有稳定的、高结合力的和特异的凝集素包被磁珠,均一的和稳定的凝集素-磁珠溶液,最佳的反应液和洗脱液。其中,磁性微粒为植物凝集素与活性磁珠通过1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺法共价偶联而得,植物凝集素为小扁豆凝集素,包被活性磁珠所用的小扁豆凝集素的投料浓度为每毫克磁珠70 μ g;试剂盒还包括保护液,保护液指:在PH7.510mM PBS或pH5.0100mM柠檬酸缓冲液中按质量体积比溶有以下组份:3%BSA、0.5%明胶、5%酪蛋白、0.03%NaN₃、0.05%Tween-20而得的溶液。

[0009] 与之前提到的现有技术一样,在上述专利中仍存在以下缺点:1)凝集素在交联剂作用下通过酰胺键直接偶联在磁性微球表面,凝集素与磁球的刚性界面直接接触,可能会导致凝集素活性降低,无法保证较高的偶联率,容易造成一定的空间位阻,影响后续的捕获分离反应的效率;2)通过磁性微球捕获分离后,需要用洗脱液将捕获的AFP-L3洗脱,步骤繁琐,易引入人为操作误差的因素对检测结果造成干扰;3)需要额外的检测试剂盒的辅助检测,难以实现自动化。

发明内容

[0010] 本发明旨在提供一种免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用,以解决现有技术中由于凝集素直接偶联在磁性微球表面,导致凝集素与磁球的刚性界面直接接触,降低了凝集素活性的技术问题。

[0011] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种免疫磁性复合物。该免疫磁性复合物包括:采用氨基聚合物修饰磁性微球得到的氨基功能化的;凝集素,凝集素与氨基聚合物连接。

[0012] 进一步地,凝集素为氧化凝集素;优选的,氧化凝集素与氨基聚合物上氨基连接;优选的,凝集素为羟基氧化成醛基的氧化凝集素,氧化凝集素通过醛基与氨基聚合物上氨基连接。

[0013] 进一步地,氨基聚合物为聚乙烯亚胺、聚酰胺、聚丙烯酰胺或聚邻苯二胺,优选为

聚乙烯亚胺。

[0014] 进一步地,免疫磁性复合物为用于捕获分离AFP-L3的免疫磁性复合物,优选的,凝集素为扁豆凝集素、小兵豆凝集素或刀豆凝集素,更优选为扁豆凝集素。

[0015] 进一步地,磁性微球包括磁球本体,磁球本体通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团;优选的,活性基团包括羧基、羟基和氨基中的至少一种;优选的,磁球本体为 Fe_2O_3 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,或者为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体;优选的,磁球本体粒径为 $0.1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$;优选的,氨基聚合物通过与活性基团反应得到氨基功能化的磁性微球。

[0016] 根据本发明的另一个方面,提供一种上述任一种免疫磁性复合物的制备方法。该制备方法包括以下步骤:1)采用氨基聚合物修饰磁性微球,得到氨基功能化的磁性微球;2)将凝集素与氨基聚合物连接形成免疫磁性复合物。

[0017] 进一步地,在凝集素与氨基聚合物连接之前,还包括对凝集素进行氧化的步骤,得到氧化凝集素;优选的,氧化凝集素与氨基聚合物上氨基连接;优选的,将凝集素中的羟基氧化成醛基,得到氧化凝集素,氧化凝集素通过醛基与氨基聚合物上氨基连接。

[0018] 进一步地,氧化步骤中采用的氧化剂为高碘酸盐,高氯酸盐,高锰酸盐,优选为高碘酸钠,高氯酸钠或高锰酸钾,更优选为高碘酸钠;优选的,氧化步骤中凝集素与氧化剂的质量浓度比为1:50-1:500;优选的,氧化的反应温度为 $20\sim 30^\circ\text{C}$,反应时间为1-4小时;优选的,凝集素的浓度范围为 $1\text{mg/mL}\sim 5\text{mg/mL}$ 。

[0019] 进一步地,步骤1)具体包括:11)采用活化剂对磁性微球进行活化;12)将活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液进行反应;13)分离出表面修饰有氨基聚合物的磁性微球,用封闭剂进行反应,得到氨基功能化的磁性微球;优选的,活化剂为二环己基碳二亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N,N'-二异丙基碳二亚胺中的至少一种;优选的,磁性微球与活化剂的质量浓度范围为:2:1-4:1;优选的,活化的反应温度为 $37^\circ\text{C}\sim 40^\circ\text{C}$,反应时间为1h-4h;优选的,步骤12)具体包括:将活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液,超声处理后,进行旋转混匀反应;优选的,氨基聚合物水溶液中氨基聚合物的浓度为 $10\text{mg/mL}\sim 200\text{mg/mL}$;优选的,活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液进行反应时,磁性微球的浓度为 $10\text{mg/mL}\sim 20\text{mg/mL}$;优选的,封闭剂为乙醇胺、BSA或明胶,封闭剂的浓度为 $0.5\sim 1\text{mol/L}$ 。

[0020] 进一步地,步骤2)具体包括:将氨基功能化的磁性微球用重悬液重悬,然后加入氧化凝集素,混合后加入还原剂搅拌反应,去上清洗涤后得到免疫磁性复合物;优选的,重悬液为碳酸氢钠溶液、Tris-HCl缓冲液或硼酸盐缓冲液,重悬液的浓度为 $0.05\text{mol/L}\sim 0.2\text{mol/L}$,pH为8-10;优选的,还原剂为硼氢化钠,硼氢化钾或四氢铝锂,所述还原剂的浓度为 $1\text{mg/mL}\sim 5\text{mg/mL}$,更优选为 5mg/mL ,优选的,氧化凝集素与氨基功能化的磁性微球的质量浓度比例为50:1-1:100;优选的,步骤2)的反应温度为 $20^\circ\text{C}\sim 30^\circ\text{C}$,反应时间为2h-6h。

[0021] 根据本发明的再一个方面,提供一种用于上述免疫磁性复合物的活性保存液。该活性保存液包括:稀释液组分、金属结合位点组分、金属螯合剂组分和生物防腐剂组分;优选的,稀释液组分为磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液或碳酸盐缓冲液,稀释液的浓度为 $0.01\sim 0.2\text{mol/L}$,pH为7-9;优选的,金属结合位点组分包括锰离子和钙离子,金属结合位点组分的浓度为 $0.5\sim 5\text{mmol/L}$,其中锰离子浓度为 $0.1\sim 1\text{mmol/L}$,钙离子浓度 $0.5\sim$

5mmol/L;优选的,所述金属结合位点组分为氯化钙、硝酸钙、溴化钙、氯化锰、硫酸锰和硝酸锰中的至少两种;优选的,金属螯合剂组分为乙二胺四乙酸、乙二胺四乙酸四钠、乙二胺四乙酸二钾和乙二胺四乙酸二钠中的至少一种;其中,金属螯合剂的工作浓度为0.05-0.2mg/mL;优选的,生物防腐剂组分包括异噻唑啉酮、 ϵ -多聚赖氨酸、叠氮钠、硫柳汞和庆大霉素中的至少一种,生物防腐剂组分的工作浓度为0.5mg/mL-2mg/mL。

[0022] 进一步地,活性保存液还包括表面活性剂组分;优选的,表面活性剂组分为聚乙二醇、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯-20和辛基苯基聚氧乙烯醚中的至少一种,表面活性剂组分的工作浓度为0.1mg/mL-0.5mg/mL;优选的,活性保存液还包括非蛋白类位点封闭剂;优选的,非蛋白类位点封闭剂为明胶、鱼皮胶和乙醇胺中的至少一种,非蛋白类位点封闭剂的工作浓度为0.5g/mL-2g/mL。

[0023] 根据本发明的又一个方面,提供一种用于捕获分离和定量检测AFP-L3的抗原捕获剂。该抗原捕获剂包括上述任一种免疫磁性复合物和活性保存液。

[0024] 进一步地,以所述磁性微球的浓度计免疫磁性复合物在活性保存液中的浓度为0.5-2mg/mL。

[0025] 根据本发明的再一个方面,提供一种用于捕获分离和定量检测AFP-L3的试剂盒。该试剂盒包括上述任一种抗原捕获剂。

[0026] 进一步,该试剂盒还包括:低浓度校准品、高度校准品、发光标记物标记的抗AFP抗体和缓冲液;优选的,低浓度校准品浓度为10.936-20.313IU/mL,高度校准品浓度为350-650IU/mL;优选的,发光标记物的工作浓度为5ng/mL-500ng/mL,抗AFP抗体的工作浓度为50ng/mL-5000ng/mL;优选的,缓冲液为碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液;优选的,发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物;碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吖啶酯及其衍生物或三联吡啶钌。

[0027] 根据本发明的又一个方面,提供一种上述免疫磁性复合物、抗原捕获剂、试剂盒在捕获分离和定量检测AFP-L3中的应用。

[0028] 进一步地,上述免疫磁性复合物、抗原捕获剂、试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

[0029] 根据本发明的又一个方面,提供一种捕获分离和定量检测AFP-L3的系统。该系统包括上述试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

[0030] 现有技术中,凝集素直接偶联在磁性微球表面,导致凝集素与磁球的刚性界面直接接触,降低了凝集素活性,无法保证较高的偶联率,容易造成一定的空间位阻,影响后续的捕获分离反应的效率。应用本发明的技术方案,凝集素实际上是通过包被在磁性微球表面的氨基聚合物介导连接在磁性微球上,氨基聚合物包被磁性微球使得磁球表面修饰上大量氨基基团,该外层聚合物具有树枝网络状结构,能够充分提高偶联载量,同时降低空间位阻,并且使得目标偶联物凝集素远离磁球的刚性表面,最大程度地保证了目标偶联物的生物活性。

具体实施方式

[0031] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0032] 本发明中的缩写解释如下:

[0033] 甲胎蛋白 (Alpha-fetoprotein/AFP)、甲胎蛋白异质体 (Alpha-fetoprotein variant/AFP-L3)、原发性肝癌 (primary hepatocellular carcinoma)、扁豆凝集素 (lens culinaris agglutinin/LCA)、磁性微球 (Magnetic microspheres/MB)、捕获分离 (Capture and separation)、CLIA (化学发光免疫分析法)、ABEI [N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺]、聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine/PEI)、DCC (二环己基碳二亚胺)、EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、CDC (N,N'-二异丙基碳二亚胺)、DMF (N,N-二甲基甲酰胺)、PEI (聚乙烯亚胺)、PA (聚酰胺)、PAM (聚丙烯酰胺)、PDI (聚邻苯二胺)。

[0034] 现有技术中,凝集素直接偶联在磁性微球表面,导致凝集素与磁球的刚性界面直接接触,降低了凝集素活性,无法保证较高的偶联率,容易造成一定的空间位阻,影响后续的捕获分离反应的效率。

[0035] 根据本发明一种典型的实施方式,提供了一种免疫磁性复合物。该免疫磁性复合物包括:采用氨基聚合物修饰磁性微球得到的氨基功能化的磁性微球,磁性微球表面修饰有氨基聚合物;凝集素,凝集素与氨基聚合物连接。

[0036] 应用本发明的技术方案,凝集素实际上是通过包被在磁性微球表面的氨基聚合物介导连接在磁性微球上,氨基聚合物包被磁性微球使得磁球表面修饰上大量氨基基团,该外层聚合物具有树枝网络状结构,能够充分提高偶联载量,同时降低空间位阻,并且使得目标偶联物凝集素远离磁性微球的刚性表面,最大程度地保证了目标偶联物的生物活性。当使用该免疫磁性复合物对AFP-L3的捕获分离时,其捕获分离效率就会得到极大的提高。

[0037] 在本发明中,氨基聚合物修饰磁性微球后而连接在磁性微球上的部分并不是氨基聚合物的整体,而是去除了反应基团后的部分,但是为了指明凝集素具体与氨基功能化的磁性微球的哪部分连接,也称之为氨基聚合物。

[0038] 优选的,凝集素为氧化凝集素;更优选的,氧化凝集素与所述氨基聚合物上氨基连接;进一步优选的,凝集素羟基氧化成醛基的氧化凝集素,氧化凝集素通过醛基与氨基聚合物上氨基连接。凝集素糖链结构上的羟基氧化为醛基,而该氧化凝集素与氨基聚合物介导的磁性微球在常温直接反应,无需交联剂的促进作用,通过两者基团之间形成的Schiff碱键共价结合,形成复合物。由于反应中没有交联剂参与,在室温下进行,体系pH呈中性偏弱碱性,反应温和,最大限度保证了凝集素的活性。

[0039] 根据本发明一种典型的实施方式,氨基聚合物为聚乙烯亚胺、聚酰胺、聚丙烯酰胺或聚邻苯二胺,优选为聚乙烯亚胺。

[0040] 根据本发明一种典型的实施方式,免疫磁性复合物为用于捕获分离AFP-L3的免疫磁性复合物,优选的,凝集素为扁豆凝集素、小兵豆凝集素或刀豆凝集素,更优选为扁豆凝集素。

[0041] 根据本发明一种典型的实施方式,磁性微球包括磁球本体,磁球本体通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团;优选的,活性基团包括羧基、羟基和氨基中的至少一种;优选的,磁球本体为Fe₂O₃磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,或者为Fe₃O₄磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体;进一步优选的,磁球本体粒径为0.1μm~5μm;氨基聚合物通过与活性基团反应得到所述氨基功能化的磁性微球。该磁性微球通过将纳米级的Fe₂O₃磁性粒子和有机高分子材料进行复合(或纳米级的Fe₃O₄磁性粒子和有机高分子材料

进行复合),形成具有超顺磁性和极大量蛋白吸附容量的微米级的固相微球,具有在外加磁场作用下可迅速被磁化,在撤走磁场后剩磁为零的属性。此外,这种磁球通过表面改性使磁球表面连接活性基团,不仅减少非特异性吸附,且增加体系的稳定性,不产生凝聚,同时显著提高结合率。

[0042] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种上述任一种免疫磁性复合物的制备方法。该制备方法包括以下步骤:1)采用氨基聚合物修饰磁性微球,得到氨基功能化的磁性微球;2)将凝集素与氨基聚合物连接形成免疫磁性复合物。

[0043] 氨基聚合物包被磁性微球使得磁性微球表面修饰上大量氨基基团,该外层聚合物具有树枝网络状结构,能够充分提高偶联载量,同时降低空间位阻,并且使得目标偶联物凝集素远离磁性微球的刚性表面,最大程度地保证了目标偶联物的生物活性。当使用该免疫磁性复合物对AFP-L3的捕获分离时,其捕获分离效率就会得到极大的提高。

[0044] 优选的,在凝集素与氨基聚合物上的氨基连接之前,还包括对凝集素进行氧化的步骤,得到氧化凝集素;优选的,氧化凝集素与所述氨基聚合物上氨基连接;优选的,将凝集素中的羟基氧化成醛基,得到氧化凝集素,氧化凝集素通过醛基与所述氨基聚合物上氨基连接。凝集素糖链结构上的羟基氧化为醛基,而该氧化凝集素与氨基聚合物介导的磁性微球在常温直接反应,无需交联剂的促进作用,通过两者基团之间形成的Schiff碱键共价结合,形成复合物。由于反应中没有交联剂参与,在室温下进行,体系pH呈中性偏弱碱性,反应温和,最大限度保证了凝集素的活性。

[0045] 根据本发明一种典型的实施方式,氧化步骤中采用的氧化剂为高碘酸盐,高氯酸盐,高锰酸盐,优选为高碘酸钠,高氯酸钠或高锰酸钾,更优选为高碘酸钠。因为高碘酸钠最能恰到好处的将凝集素糖链上的羟基氧化为醛基,而不至于过度氧化成羧基,因为如果生产羧基,易导致自身交联,易导致凝集素失活。另外,羧基与氨基反应需要交联剂的作用,不利于维持凝集素的最大活性。

[0046] 优选的,氧化步骤中凝集素与氧化剂的质量浓度比为1:50-1:500;在此比例范围内,易保证将凝集素糖链上的羟基氧化为醛基。进一步优选的,氧化的反应温度为20-30℃,反应时间为1-4小时;在此反应温度及时间条件下,有利于维持凝集素的最大活性。优选的,的凝集素的浓度范围为1mg/mL-5mg/mL。

[0047] 根据本发明一种典型的实施方式,步骤1)具体包括:11)采用活化剂对磁性微球进行活化;12)将活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液进行反应;13)分离出表面修饰有氨基聚合物的磁性微球,用封闭剂进行反应,去上清洗涤后得到氨基功能化的磁性微球;优选的,活化剂为二环己基碳二亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N,N'-二异丙基碳二亚胺中的至少一种;优选的,磁性微球与活化剂的质量浓度为:2:1-4:1;优选的,活化的反应温度为37℃-40℃,反应时间为1h-4h;优选的,步骤12)具体包括:将活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液,超声处理后,进行旋转混匀反应;优选的,超声处理的时间为5min-15min;优选的,旋转混匀反应的温度为25℃-30℃,时间为2h-6h;优选的,氨基聚合物水溶液中氨基聚合物的浓度为10mg/mL-200mg/mL;优选的,活化好的磁性微球加入到氨基聚合物水溶液进行反应时,磁性微球的浓度为10mg/mL-20mg/mL;优选的,封闭剂为乙醇胺、BSA或明胶,封闭剂的浓度为0.5-1mol/L,反应时间为1h-4h。

[0048] 根据本发明一种典型的实施方式,步骤2)具体包括:将氨基功能化的磁性微球用

重悬液重悬,然后加入氧化凝集素,混合后加入还原剂搅拌反应,去上清洗涤后得到免疫磁性复合物;优选的,重悬液为0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液、Tris-HCl缓冲液或硼酸盐缓冲液,重悬液的浓度为0.05mol/L-0.2mol/L,pH为8-10;优选的,优选的还原剂为硼氢化钠、硼氢化钾或四氢铝锂,更优选为硼氢化钠,所述还原剂的浓度为1mg/mL-5mg/mL,更优选为5mg/mL;优选的,氧化凝集素与氨基功能化的磁性微球的质量浓度比例为1:50-1:100;优选的,步骤2)的反应温度为20℃-30℃,反应时间为2h-6h。

[0049] 上述反应条件设置的最终目的,均是为了增强凝集素的反应活性,提高凝集素偶联磁球的偶联率,从而提高凝集素的捕获效率。

[0050] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种用于上述免疫磁性复合物的活性保存液。该活性保存液包括:稀释液组分、金属结合位点组分、金属螯合剂组分和生物防腐剂组分。由于凝集素是通过凝集素表面的岩藻糖残基结合,且凝集素表面存在多个金属离子结合位点,通过在偶联合成完毕的磁球悬浮液(保存液)中添加适宜浓度的二价金属离子(例如钙离子、锰离子、镁离子等)以及蛋白酶抑制剂(金属螯合剂组分)、防腐剂等,能够保证凝集素在液体环境中的活性以及稳定性,进一步保证了凝集素磁性微球的反应活性。

[0051] 稀释液组分包括但不限于磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液或碳酸盐缓冲液,稀释液的浓度为0.01-0.2mol/L,pH为7-9;作用是在一定程度上抵消、减轻外加强酸或强碱对溶液酸碱度的影响,从而维持溶液的pH值相对稳定。

[0052] 金属结合位点组分包括锰离子和钙离子,所述金属结合位点组分的浓度为0.5-5mmol/L,其中锰离子浓度为0.1-1mmol/L,钙离子浓度0.5-5mmol/L;优选的,金属结合位点组分包括但不限于氯化钙、硝酸钙、溴化钙、氯化锰、硫酸锰和硝酸锰中的至少两种;其作用主要是与凝集素的金属识别位点相结合,激活扁豆凝集素的生物活性。

[0053] 金属螯合剂组分包括但不限于乙二胺四乙酸、乙二胺四乙酸四钠、乙二胺四乙酸二钾和乙二胺四乙酸二钠中的至少一种;其中,金属螯合剂的工作浓度为0.05-0.2mg/mL;作用是通过螯合剂分子与金属离子的强结合作用,将金属离子包合到螯合剂内部,稳定金属离子,防止活泼金属离子发生氧化或解离。

[0054] 生物防腐剂组分包括但不限于异噻唑啉酮、 ϵ -多聚赖氨酸、叠氮钠、硫柳汞和庆大霉素中的至少一种,生物防腐剂组分的工作浓度为0.5mg/mL-2mg/mL。作用是抑制对微生物的酶活力或对微生物的细胞遗传结构产生影响,从而抑制或杀灭细菌等微生物。

[0055] 本发明中的保存液针对凝集素的特性,能够较好地维持凝集素的活性,保护免疫磁性微球在均相体系中不被破坏或团聚。

[0056] 优选的,保存液还包括表面活性剂组分;表面活性剂组分包括但不限于聚乙二醇、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯-20和辛基苯基聚氧乙烯醚中的至少一种,表面活性剂组分的工作浓度为0.1mg/mL-0.5mg/mL;作用是降低免疫磁性微球之间的表面张力,提高免疫磁性微球在均相体系内的分散性。

[0057] 优选的,保存液还包括非蛋白类位点封闭剂;非蛋白类位点封闭剂包括但不限于明胶、鱼皮胶和乙醇胺中的至少一种,非蛋白类位点封闭剂的工作浓度为0.5g/mL-2g/mL;作用是封闭磁球上未与参与反应的活性基团。

[0058] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种用于上述免疫磁性复合物活性保存液。该保存液包括以下组分:(1) 稀释液组分为磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲

液或碳酸盐缓冲液;其中,稀释液的浓度为0.01-0.2mol/L;pH为7-9;(2)金属结合位点组分,氯化钙,硝酸钙,溴化钙,氯化锰,硫酸锰和硝酸锰中的至少两种;其浓度为0.5-5mmol/L,且锰离子,浓度为0.1-1mmol/L,钙离子浓度0.5-5mmol/L;(3)金属螯合剂组分为乙二胺四乙酸(EDTA),乙二胺四乙酸四钠(EDTA-4Na),乙二胺四乙酸二钾(EDTA-2K)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)中的至少一种;其中,金属螯合剂的工作浓度为0.05-0.2mg/mL;(4)表面活性剂组分为聚乙二醇,聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯-20和辛基苯基聚氧乙烯醚中的至少一种;其中,表面活性剂的工作浓度为0.1mg/mL-0.5mg/mL;(5)非蛋白类位点封闭剂为明胶,鱼皮胶和乙醇胺中的至少一种;其中,非蛋白类位点封闭剂的工作浓度为0.5g/mL-2g/mL;(6)生物防腐剂组分为异噻唑啉酮, ϵ -多聚赖氨酸,叠氮钠,硫柳汞和庆大霉素中的至少一种;其中,生物防腐剂的工作浓度为0.5mg/mL-2mg/mL。

[0059] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种用于捕获分离和定量检测AFP-L3的抗原捕获剂。该抗原捕获剂包括上述任一种免疫磁性复合物和活性保存液。优选的,以磁性微球的浓度计免疫磁性复合物在活性保存液中的浓度为0.5-2mg/mL。

[0060] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种用于捕获分离和定量检测AFP-L3的试剂盒。该试剂盒包括上述任一种抗原捕获剂。

[0061] 优选的,该试剂盒还包括:低浓度校准品、高度校准品、发光标记物标记的抗AFP抗体(优选为抗AFP单克隆抗体)和缓冲液;优选的,低浓度校准品浓度为10.936-20.313IU/Ml,高度校准品浓度为350-650IU/Ml;优选的,发光标记物的工作浓度为5ng/mL-500ng/mL,抗AFP抗体工作浓度为50ng/mL-5000ng/mL;优选的,缓冲液为碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液;优选的,发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物;碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吡啶酯及其衍生物或三联吡啶钌。

[0062] 根据本发明一种典型的实施方式,用于捕获分离和定量检测AFP-L3的试剂盒具体包括如下组分:

[0063] a. AFP-L3抗原捕获剂,磁球浓度为0.5-2mg/mL

[0064] b. 低浓度校准品(AFP-L3抗原),浓度:10.936-20.313IU/Ml

[0065] c. 高浓度校准品(AFP-L3抗原),浓度:350-650IU/Ml

[0066] d. 发光标记物标记的抗AFP单克隆抗体

[0067] 发光标记物包括但不限于鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物,具体的有ABEI(N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺),AHEI(N-(6-氨基己基)-N-乙基异鲁米诺),ITCI(异硫氰酸异鲁米诺),ITCBEI(N-(4-异硫氰基丁基)-N-乙基异鲁米诺)

[0068] 发光标记物浓度:5ng/mL-500ng/mL,

[0069] 抗AFP单克隆抗体的浓度:50ng/mL-5000ng/mL;

[0070] e. Buffer缓冲液

[0071] Buffer缓冲液的成分包括但不限于:碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液。

[0072] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种上述免疫磁性复合物、抗原捕获剂、试剂盒在捕获分离和定量检测AFP-L3中的应用。

[0073] 现有技术中的捕获分离和定量检测AFP-L3的磁性微球,捕获分离后需要人工操

作,这样人为操作易引入误差与干扰,无法保证检测结果的可靠性。本发明的免疫磁性复合物、抗原捕获剂、试剂盒能够应用于半自动或全自动免疫分析仪,从而实现捕获与检测一体化、自动化,提高检测结果的准确性。

[0074] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种捕获分离和定量检测AFP-L3的系统。该系统包括上述试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

[0075] 根据本发明一种典型的实施方式,凝集素偶联的磁性微球、稀释液、检测抗体和示踪标记物均集成在一个试剂盒中,使用Maglumi全自动化学发光免疫测定仪能够实现加样、捕获、分离和检测于一体,能够保证操作过程无人为干扰因素和检测结果的高准确度、高灵敏度。凝集素包被的磁性微球在捕获分离完待测物中的AFP-L3后,经过Maglumi全自动化学发光免疫测定仪系统液的自动清洗后,洗去未结合的其他物质,加入发光标记物ABEI标记的抗AFP单克隆抗体,与凝集素捕获AFP-L3的磁球复合物形成免疫复合物,实现AFP-L3的检测。

[0076] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法。该方法包括以下步骤:

[0077] 1.凝集素的氧化改造:凝集素与氧化处理剂水溶液混合,避光,慢速搅拌反应,得到凝集素的氧化产物(lectin-CHO)。

[0078] 其中,所述凝集素包括但不限于扁豆凝集素、小兵豆凝集素、刀豆凝集素,并优选扁豆凝集素;氧化处理剂包括但不限于高碘酸钠、高氯酸钠、高锰酸钾;反应温度为20-30℃,反应时间为1-4小时;凝集素与氧化处理剂的质量浓度比例为1:50-1:500。

[0079] 2.聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备:

[0080] 取一定量的磁球,加入活化剂,然后加入重悬液配制成一定浓度的磁球溶液,将其置于水浴锅中并振摇或者机械搅拌反应,将活化好的纳米磁球溶液去除上清液,并加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,配制成一定浓度的磁球溶液,备用。活化好的磁球,加入氨基聚合物的水溶液,超声处理后,将其置于一定温度下进行旋转混匀反应,磁分离除去上清,并用PBS缓冲液洗涤3次,然后用封闭剂进行反应,再用PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0081] 其中,活化剂包括但不限于DCC(二环己基碳二亚胺),EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐),CDC(N,N'-二异丙基碳二亚胺),磁球与活化剂的比例为:2:1-4:1;重悬液包括但不限于水,乙醇,DMF(N,N-二甲基甲酰胺);活化反应的温度为:37℃-40℃;活化反应时间为1h-4h;磁性微球与氨基聚合物的质量比为1:1-10:1;氨基聚合物包括但不限于PEI(聚乙烯亚胺),PA(聚酰胺),PAM(聚丙烯酰胺),PDI(聚邻苯二胺);氨基聚合物的浓度为10mg/mL-200mg/mL,磁性微球的浓度为10mg/mL-20mg/mL;超声时间为:5min-15min;旋转反应的温度为:25℃-30℃,反应时间为2h-6h;封闭剂包括但不限于乙醇胺,BSA,明胶,封闭剂的浓度为0.5-1mol/L,反应时间为1h-4h。

[0082] 3.氧化处理的凝集素-氨基功能化的磁性微球偶联产物的制备:

[0083] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其达到一定浓度(以纳米磁球计),加入凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄溶液,搅拌反应,除去反应好的磁性微球溶液上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0084] 其中,氧化处理的凝集素与氨基聚合物功能化磁球的质量浓度比为1:50-1:100,反应的温度为:20℃-30℃;反应时间为2h-6h。

[0085] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种检测AFP-L3的免疫测定方法,其包括采用上述用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法捕获分离AFP-L3。

[0086] 下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0087] 以下实施例及对比例中涉及的部分原材料来源如下:

[0088] 扁豆凝集素LCA(来源:Aladdin公司L140096)

[0089] 高碘酸钠(来源:Sigma公司)

[0090] 聚乙烯亚胺(来源:Sigma公司)

[0091] 磁性微球(来源:新产业生物医学工程股份有限公司生产)

[0092] ABEI(来源:新产业生物医学工程股份有限公司生产)

[0093] Anti-AFP antibody(来源:Meridian)

[0094] AFP校准品(来源:Meridian)

[0095] 实施例1

[0096] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0097] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0098] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25℃条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0099] 制备2:聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0100] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于38℃水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0101] 制备3:扁豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0102] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0103] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0104] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0105] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0106] 氯化锰,浓度为1mmol/L,

[0107] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0108] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

- [0109] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;
- [0110] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。
- [0111] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备
- [0112] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原的捕获试剂。
- [0113] 制备6:ABEI标记抗AFP单克隆抗体
- [0114] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 μ g/mL。
- [0115] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:
- [0116] a.按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂(凝集素氧化产物和磁性微球均为免疫磁性复合物的部分,但为了计量方便,分别以凝集素氧化产物和磁性微球的浓度计量。后续实施例及对比例同样类似计量):
- [0117] 凝集素氧化产物的浓度:20 μ g/mL,
- [0118] 磁性微球浓度:1mg/mL,
- [0119] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;
- [0120] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,
- [0121] 氯化锰,浓度为1mmol/L;
- [0122] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;
- [0123] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;
- [0124] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;
- [0125] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL
- [0126] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;
- [0127] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;
- [0128] d.按照制备6得到的ABEI标记的抗AFP单克隆抗体
- [0129] ABEI浓度:250ng/mL,
- [0130] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;
- [0131] e.Buffer缓冲液
- [0132] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。
- [0133] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L 3的方法,其步骤具体如下:
- [0134] 1) 十点标准曲线的配制
- [0135] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。
- [0136] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0137] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0138] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0139] b.加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0140] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0141] d.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0142] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0143] f.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0144] g.加入发光底物,检测光信号强度;

[0145] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0146] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0147] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,再用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0148] 实施例2

[0149] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0150] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0151] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 16mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25 $^{\circ}$ C条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0152] 制备2:聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0153] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0154] 制备3:扁豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0155] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0156] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0157] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

- [0158] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,
- [0159] 氯化锰,浓度为1mmol/L,
- [0160] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;
- [0161] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;
- [0162] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;
- [0163] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。
- [0164] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备
- [0165] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原的捕获试剂。
- [0166] 制备6:ABEI标记抗AFP单克隆抗体
- [0167] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 μ g/mL。
- [0168] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:
- [0169] a. 按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,
- [0170] 凝集素氧化产物的浓度20 μ g/mL,
- [0171] 磁性微球工作浓度:1mg/mL,
- [0172] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;
- [0173] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,
- [0174] 氯化锰,浓度为1mmol/L;
- [0175] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;
- [0176] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;
- [0177] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;
- [0178] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL
- [0179] b. 低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;
- [0180] c. 高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;
- [0181] d. 按照制备6得到的ABEI标记的抗AFP单克隆抗体
- [0182] ABEI浓度:250ng/mL,
- [0183] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;
- [0184] e. Buffer缓冲液
- [0185] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。
- [0186] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3的方法,其步骤具体如下:
- [0187] 1) 十点标准曲线的配制
- [0188] AFP-L3企业校准品的浓度为4.6 $\times 10^6$ IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定

标校正曲线计算得到工作曲线。

[0189] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0190] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0191] a. 将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0192] b. 加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0193] c. 加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0194] d. 37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0195] e. 加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0196] f. 37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0197] g. 加入发光底物,检测光信号强度;

[0198] h. 通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0199] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0200] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,在用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0201] 实施例3

[0202] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0203] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0204] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高氯酸钠水溶液,避光,25 $^{\circ}$ C条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0205] 制备2:聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0206] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0207] 制备:3:扁豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0208] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

- [0209] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制
- [0210] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;
- [0211] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,
- [0212] 氯化锰,浓度为1mmol/L,
- [0213] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;
- [0214] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;
- [0215] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;
- [0216] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。
- [0217] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备
- [0218] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原的捕获试剂。
- [0219] 制备6:ABEI标记抗AFP单克隆抗体
- [0220] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 μ g/mL。
- [0221] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:
- [0222] a. 按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,
- [0223] 凝集素氧化产物的浓度20 μ g/mL,
- [0224] 磁性微球浓度:1mg/mL,
- [0225] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;
- [0226] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,
- [0227] 氯化锰,浓度为1mmol/L;
- [0228] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;
- [0229] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;
- [0230] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;
- [0231] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL
- [0232] b. 低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;
- [0233] c. 高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;
- [0234] d. 按照制备6得到的ABEI标记抗AFP单克隆抗体
- [0235] ABEI浓度:250ng/mL,
- [0236] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;
- [0237] e. Buffer缓冲液
- [0238] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。
- [0239] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3的方法,其步骤具体如下:
- [0240] 1) 十点标准曲线的配制

[0241] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000 IU/mL,将1000 IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0242] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0243] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0244] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0245] b.加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0246] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0247] d.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0248] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0249] f.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0250] g.加入发光底物,检测光信号强度;

[0251] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0252] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0253] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,在用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0254] 实施例4

[0255] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0256] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0257] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25 $^{\circ}$ C条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0258] 制备2:聚酰胺介导磁性微球的制备

[0259] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚酰胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0260] 制备3:扁豆凝集素改造物-聚酰胺介导磁球偶联物的制备

[0261] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,反应好的磁性微

球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0262] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0263] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0264] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0265] 氯化锰,浓度为1mmol/L,

[0266] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0267] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0268] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0269] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。

[0270] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0271] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原捕获试剂。

[0272] 制备6:ABEI标记抗AFP单克隆抗体

[0273] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 μ g/mL。

[0274] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0275] a.按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0276] 凝集素氧化产物的浓度20 μ g/mL,

[0277] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0278] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0279] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0280] 氯化锰,浓度为1mmol/L;

[0281] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0282] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0283] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0284] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL

[0285] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0286] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0287] d.ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0288] ABEI工作浓度:250ng/mL,

[0289] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;

[0290] e.Buffer缓冲液

[0291] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。

[0292] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3的方法,其步骤具体如下:

[0293] 1) 十点标准曲线的配制

[0294] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000 IU/mL,将1000 IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0295] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0296] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检

[0297] 测,检测步骤包括:

[0298] a. 将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0299] b. 加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0300] c. 加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0301] d. 37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0302] e. 加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0303] f. 37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0304] g. 加入发光底物,检测光信号强度;

[0305] h. 通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0306] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0307] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,在用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0308] 实施例5

[0309] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0310] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0311] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25 $^{\circ}$ C条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0312] 制备2:聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0313] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加5毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0314] 制备3:扁豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0315] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0316] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0317] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0318] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0319] 氯化锰,浓度为1mmol/L,

[0320] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0321] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0322] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0323] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。

[0324] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0325] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原捕获试剂。

[0326] 制备6:发光标记物标记抗AFP单克隆抗体

[0327] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100μg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15μg/mL。

[0328] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0329] a.按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0330] 凝集素氧化产物的浓度20μg/mL,

[0331] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0332] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0333] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0334] 氯化锰,工作浓度为1mmol/L;

[0335] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0336] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0337] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0338] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL

[0339] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0340] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0341] d.ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0342] ABEI浓度:250ng/mL,

[0343] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;

[0344] e. Buffer缓冲液

[0345] Buffer缓冲液的成分: 0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液, 5mmol/L氯化钠, 1mmol/L氯化锰。

[0346] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3方法的建立, 其步骤具体如下:

[0347] 1) 十点标准曲线的配制

[0348] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL, 用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000 IU/mL, 将1000 IU/mL的中间品依次梯度稀释, 分别得到十点曲线的浓度点, 通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0349] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0350] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒, 在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检

[0351] 测, 检测步骤包括:

[0352] a. 将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0353] b. 加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0354] c. 加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0355] d. 37 $^{\circ}$ C温育15min, 置于磁环境下清洗3次;

[0356] e. 加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0357] f. 37 $^{\circ}$ C温育15min, 置于磁环境下清洗3次;

[0358] g. 加入发光底物, 检测光信号强度;

[0359] h. 通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0360] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0361] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本, 通过凝集素电泳的方法, 测定得到其样本中AFP-L3的实际含量, 在用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量, 通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0362] 实施例6

[0363] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0364] 制备1: 扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0365] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素, 在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液, 避光, 25 $^{\circ}$ C条件下缓慢搅拌反应2小时, 得到扁豆凝集素的氧化产物 (LECTIN-CHO)。

[0366] 制备2: 聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0367] 取一定量的磁球, 按每毫克磁球加入0.5mg的DCC, 然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL, 置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时; 活化好的纳米磁球溶液去除上清液, 然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液, 使其浓度达到20mg/mL (以纳米磁球计); 以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液, 超声10min, 在室温下旋转混匀反应4h, 磁分离后弃去上清; 用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次, 每次3min; 用1mol/L的乙醇胺封闭反应

2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0368] 制备3:扁豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0369] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0370] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0371] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0372] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0373] 氯化锰,浓度为1mmol/L,

[0374] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0375] (4) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。

[0376] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0377] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原捕获试剂。

[0378] 制备6:发光标记物标记抗AFP单克隆抗体

[0379] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100μg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15μg/mL。

[0380] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0381] a.按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0382] 凝集素氧化产物的浓度20μg/mL,

[0383] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0384] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0385] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0386] 氯化锰,工作浓度为1mmol/L;

[0387] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0388] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL

[0389] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0390] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0391] d.ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0392] ABEI浓度:250ng/mL,

[0393] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;

[0394] e.Buffer缓冲液

[0395] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。

[0396] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3方法的建立,其步骤具体如下:

[0397] 1) 十点标准曲线的配制

[0398] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0399] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0400] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0401] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0402] b.加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0403] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0404] d.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0405] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0406] f.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0407] g.加入发光底物,检测光信号强度;

[0408] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0409] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0410] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,在用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0411] 实施例7

[0412] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒

[0413] 制备1:刀豆凝集素氧化改造物的制备

[0414] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的刀豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25 $^{\circ}$ C条件下缓慢搅拌反应2小时,得到刀豆凝集素的氧化产物。

[0415] 制备2:聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0416] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0417] 制备3:刀豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0418] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的刀豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到刀豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0419] 制备4:刀豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0420] (1) 稀释液组分:磷酸缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0421] (2) 金属结合位点组分:硝酸钙,浓度为5mmol/L,

[0422] 硝酸锰,浓度为1mmol/L,

[0423] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸二钾,浓度为0.1mg/mL;

[0424] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0425] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0426] (6) 生物防腐剂组分:叠氮钠,浓度为1.5mg/mL。

[0427] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0428] 将制备3中包被刀豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原捕获试剂。

[0429] 制备6:发光标记物标记抗AFP单克隆抗体

[0430] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100μg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15μg/mL。

[0431] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0432] a. 按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0433] 凝集素氧化产物的浓度20μg/mL,

[0434] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0435] 稀释液组分:磷酸缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0436] 金属结合位点组分:硝酸钙,浓度为5mmol/L,

[0437] 硝酸锰,工作浓度为1mmol/L;

[0438] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸二钾,浓度为0.1mg/mL;

[0439] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0440] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0441] 生物防腐剂组分:叠氮钠,浓度为1.5mg/mL

[0442] b. 低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0443] c. 高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0444] d. ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0445] ABEI浓度:250ng/mL,

[0446] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;

[0447] e.Buffer缓冲液

[0448] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。

[0449] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3的方法,其步骤具体如下:

[0450] 1) 十点标准曲线的配制

[0451] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0452] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0453] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检

[0454] 测,检测步骤包括:

[0455] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0456] b.加入20 μ L刀豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0457] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0458] d.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0459] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0460] f.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0461] g.加入发光底物,检测光信号强度;

[0462] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0463] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0464] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,在用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0465] 对比例1

[0466] 制备1:扁豆凝集素包被磁性微球的制备

[0467] 取一定量的磁性微球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素,混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素包被的磁性微球。

[0468] 制备2:ABEI标记抗AFP单克隆抗体

[0469] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记

好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 μ g/mL。

[0470] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0471] a.按照制备1得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0472] 凝集素的浓度20 μ g/mL,

[0473] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0474] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0475] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0476] d.按照制备2得到的ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0477] ABEI工作浓度:250ng/mL,

[0478] 抗AFP单克隆抗体的工作浓度:5000ng/mL;

[0479] e.Buffer缓冲液

[0480] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。

[0481] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3的方法,其步骤具体如下:

[0482] 1) 十点标准曲线的配制

[0483] AFP-L3企业校准品的浓度为4.6 $\times 10^6$ IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0484] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0485] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0486] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0487] b.加入20 μ L扁豆凝集素-磁性微球溶液;

[0488] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0489] d.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0490] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0491] f.37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0492] g.加入发光底物,检测光信号强度;

[0493] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0494] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0495] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,再用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0496] 对比例2

[0497] 聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0498] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38℃水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0499] 制备2:扁豆凝集素包被聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0500] 取一定量的磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素,混合后,加入5mg/mL的NaBH₄溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素包被的磁性微球。

[0501] 制备3:活性保存液的配制

[0502] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0503] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0504] 氯化锰,浓度为1mmol/L,

[0505] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0506] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0507] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0508] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。

[0509] 制备4:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0510] 将制备2中包被扁豆凝集素包被磁性微球悬浮于制备3中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原的捕获试剂。

[0511] 制备5:ABEI标记抗AFP单克隆抗体

[0512] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100μg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15μg/mL。

[0513] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0514] a. 按照制备4得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0515] 凝集素的浓度20μg/mL,

[0516] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0517] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,工作浓度为0.02mol/L;

[0518] 金属结合位点组分:氯化钙,工作浓度为5mmol/L,

[0519] 氯化锰,工作浓度为1mmol/L;

[0520] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),工作浓度为0.1mg/mL;

[0521] 表面活性剂组分:聚乙二醇,工作浓度为0.1mg/mL;

- [0522] 位点封闭剂组分:明胶,工作浓度为0.5g/mL;
- [0523] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,工作浓度为1.5mg/mL
- [0524] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;
- [0525] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;
- [0526] d.按照制备5得到的ABEI标记的抗AFP单克隆抗体
- [0527] ABEI工作浓度:250ng/mL,
- [0528] 抗AFP单克隆抗体工作浓度:5000ng/mL;
- [0529] e.Buffer缓冲液
- [0530] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。
- [0531] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3方法的建立,其步骤具体如下:
- [0532] 1) 十点标准曲线的配制
- [0533] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。
- [0534] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用
- [0535] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:
- [0536] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;
- [0537] b.加入20 μ L扁豆凝集素-磁性微球溶液;
- [0538] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;
- [0539] d.37℃温育15min,置于磁环境下清洗3次;
- [0540] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;
- [0541] f.37℃温育15min,置于磁环境下清洗3次;
- [0542] g.加入发光底物,检测光信号强度;
- [0543] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。
- [0544] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用
- [0545] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,再用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。
- [0546] 对比例3
- [0547] 一种用于增强AFP-L3捕获分离效率的方法及其检测试剂盒
- [0548] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备
- [0549] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25℃条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0550] 制备2:扁豆凝集素改造物包被磁球偶联物的制备

[0551] 取一定量的磁性微球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0552] 制备3:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0553] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0554] (2) 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0555] 氯化锰,浓度为1mmol/L,

[0556] (3) 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0557] (4) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0558] (5) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0559] (6) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。

[0560] 制备4:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0561] 将制备2中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备3中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原的捕获试剂。

[0562] 制备5:ABEI标记抗AFP单克隆抗体

[0563] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100μg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15μg/mL。

[0564] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0565] a. 按照制备4得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0566] 凝集素氧化产物的浓度20μg/mL,

[0567] 磁性微球浓度:1mg/mL,

[0568] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0569] 金属结合位点组分:氯化钙,浓度为5mmol/L,

[0570] 氯化锰,浓度为1mmol/L;

[0571] 金属螯合剂组分:乙二胺四乙酸(EDTA),浓度为0.1mg/mL;

[0572] 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0573] 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0574] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL

[0575] b. 低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0576] c. 高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0577] d. 按照制备5得到的ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0578] ABEI浓度:250ng/mL,

[0579] 抗AFP单克隆抗体的浓度:5000ng/mL;

[0580] e. Buffer缓冲液

[0581] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。

[0582] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3方法的建立,其步骤具体如下:

[0583] 1) 十点标准曲线的配制

[0584] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000 IU/mL,将1000 IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0585] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0586] a. 将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0587] b. 加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0588] c. 加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0589] d. 37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0590] e. 加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0591] f. 37 $^{\circ}$ C温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0592] g. 加入发光底物,检测光信号强度;

[0593] h. 通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0594] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0595] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,再用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0596] 对比例4

[0597] 制备1:扁豆凝集素氧化改造物的制备

[0598] 用新鲜配制的0.2mol/L碳酸氢钠水溶液溶解2mg的扁豆凝集素,在上述溶液中逐滴滴加新鲜配制的0.5mL 8mmol/L高碘酸钠水溶液,避光,25 $^{\circ}$ C条件下慢速搅拌反应2小时,得到扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO)。

[0599] 制备2:聚乙烯亚胺介导磁性微球的制备

[0600] 取一定量的磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入乙醇溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38 $^{\circ}$ C水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时;活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);以每毫克磁球添加10毫克聚乙烯亚胺水溶液,超声10min,在室温下旋转混匀反应4h,磁分离后弃去上清;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,每次3min;用1mol/L的乙醇胺封闭反应2h;用0.01mol/L pH7.5的PBS缓冲液洗涤3次,磁分离后弃去上清,得到氨基功能化的磁性微球,备用。

[0601] 制备3:扁豆凝集素改造物-聚乙烯亚胺介导磁球偶联物的制备

[0602] 取一定量的氨基聚合物功能化磁球,用0.1mol/L pH9.2碳酸氢钠水溶液重悬,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计),按每毫克磁球加入0.5mg的扁豆凝集素的氧化产物(LECTIN-CHO),混合后,加入5mg/mL的NaBH₄碱溶液,25℃搅拌反应4小时,反应好的磁性微球溶液去除上清液,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到扁豆凝集素氧化物包被的磁性微球。

[0603] 制备4:扁豆凝集素氧化物磁性微球活性保存液的配制

[0604] (1) 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,浓度为0.02mol/L;

[0605] (2) 表面活性剂组分:聚乙二醇,浓度为0.1mg/mL;

[0606] (3) 位点封闭剂组分:明胶,浓度为0.5g/mL;

[0607] (4) 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,浓度为1.5mg/mL。

[0608] 制备5:AFP-L3抗原捕获试剂的制备

[0609] 将制备3中包被扁豆凝集素氧化物的磁球悬浮于制备4中配制的免疫磁性活性保存液中,得到AFP-L3抗原的捕获试剂。

[0610] 制备6:ABEI标记抗AFP单克隆抗体

[0611] 取1mg抗AFP单克隆抗体,用0.1mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mL,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的抗AFP单克隆抗体,加入100μg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的抗AFP单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15μg/mL。

[0612] 一种捕获分离和检测AFP-L3的试剂盒,含有下述组分:

[0613] a.按照制备5得到的AFP-L3抗原捕获试剂,

[0614] 凝集素氧化产物的工作浓度20μg/mL,

[0615] 磁性微球工作浓度:1mg/mL,

[0616] 稀释液组分:硼酸盐缓冲液,pH7.2,工作浓度为0.02mol/L;

[0617] 表面活性剂组分:聚乙二醇,工作浓度为0.1mg/mL;

[0618] 位点封闭剂组分:明胶,工作浓度为0.5g/mL;

[0619] 生物防腐剂组分:甲基异噻唑啉酮,工作浓度为1.5mg/mL

[0620] b.低浓度校准品,浓度:15.625IU/mL;

[0621] c.高浓度校准品,浓度:500.000IU/mL;

[0622] d.按照制备6得到的ABEI标记的抗AFP单克隆抗体

[0623] ABEI工作浓度:250ng/mL,

[0624] 抗AFP单克隆抗体工作浓度:5000ng/mL;

[0625] e.Buffer缓冲液

[0626] Buffer缓冲液的成分:0.02mol/L pH7.2的硼酸盐缓冲液,5mmol/L氯化钠,1mmol/L氯化锰。

[0627] 一种用上述试剂盒捕获分离并检测血清中AFP-L3的方法,其步骤具体如下:

[0628] 1) 十点标准曲线的配制

[0629] AFP-L3企业校准品的浓度为 4.6×10^6 IU/mL,用0.02M PBS缓冲液将其稀释至1000IU/mL,将1000IU/mL的中间品依次梯度稀释,分别得到十点曲线的浓度点,通过2点定标校正曲线计算得到工作曲线。

[0630] 2) 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的使用

[0631] 利用该方法生捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒,在本司研发生产的Maglumi 2000Plus仪器上检测,检测步骤包括:

[0632] a.将20 μ L待测样本、高低浓度校准品加入到反应杯中;

[0633] b.加入20 μ L扁豆凝集素氧化物-磁性微球溶液;

[0634] c.加入100 μ L Buffer缓冲液;

[0635] d.37℃温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0636] e.加入200 μ L ABEI标记的抗AFP单克隆抗体;

[0637] f.37℃温育15min,置于磁环境下清洗3次;

[0638] g.加入发光底物,检测光信号强度;

[0639] h.通过校准品修正后的工作曲线可根据样本检测光强度自动计算得出待测样本的AFP-L3浓度。

[0640] 捕获分离和检测AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒对原发性肝癌样本的检测与应用

[0641] 选择了3支经临床确诊的原发性肝癌的血清样本,通过凝集素电泳的方法,测定得到其样本中AFP-L3的实际含量,再用本实施例方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒测定其样本中AFP-L3的含量,通过两个测定浓度来计算本方案制作得到的AFP-L3化学发光免疫分析试剂盒的AFP-L3的捕获分离效率。

[0642] 实验数据和结果分析

[0643]

样本描述		实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	对比 例 1	对比 例 2	对比 例 3	对比 例 4
原发性肝癌样本 1	AFP-L3 确证含量 ng/mL	48.65										
	AFP-L3 测定含量 ng/mL	30.94	26.3	23.21	23.52	25.68	24.65	29.28	17.33	18.56	14.85	14.85
	捕获分离效率 %	63.6	54.1	47.7	48.3	52.8	50.7	60.1	35.6	38.2	30.5	30.5
原发性肝癌样本 2	AFP-L3 确证含量 ng/mL	168.3										
	AFP-L3 测定含量 ng/mL	118.81	91.89	82.69	84.6	91.51	81.63	116.23	61.14	64.87	53.43	54.98
	捕获分离效率 %	70.6	54.6	49.1	50.3	54.4	48.5	69.1	36.3	38.5	31.7	32.7
原发性肝癌样本 3	AFP-L3 确证含量 ng/mL	359.6										
	AFP-L3 测定含量 ng/mL	302.1	206.16	194.34	195.23	215.07	188.3	300.6	138.47	152.46	122.16	124.51
	捕获分离效率 %	84	57.3	54	54.3	59.8	52.4	83.6	38.5	42.4	34	34.6

[0644] 从上述实验数据可知,采用实施例提供的试剂盒检测AFP-L3,其对AFP-L3的捕获分离效率均明显优于对比例AFP-L3的捕获分离效率,说明采用本发明的技术将凝集素经过氧化剂作用后,生成的醛基基团可直接与氨基基团反应,无需活化剂和交联剂的辅助反应,保证了凝集素的活性;将磁性微球经过氨基聚合物功能化处理后,磁性微球表面形成树枝网络状结构,减少磁球与凝集素之间的空间位阻,并使氨基基团的载量大大提高,从而提高

了凝集素对AFP-L3的捕获分离效率;使用本发明提供的凝集素磁性微球活性保护液,针对凝集素的特性,能够较好地维持凝集素的活性,保护免疫磁性微球在均相体系中不被破坏或团聚,在一定程度上对凝集素的活性以及捕获分离效率上起到促进作用,因此,采用本发明的技术方案能增强凝集素的反应活性,提高凝集素偶联磁球的效率,提高AFP-L3的捕获效率。

[0645] 由实施例1与实施例2的测定结果对比可知,当处理凝集素的氧化剂浓度过量时,会导致凝集素的氧化结果形成羧基而不是醛基,从而进一步影响与氨基聚合物功能化磁球的偶联效率。

[0646] 由实施例1与实施例3的测定结果对比可知,更换处理凝集素的氧化剂,可能会对氧化效果造成影响,高氯酸钠的氧化性要强于高碘酸钠,会导致凝集素的部分活性失活。

[0647] 由实施例1与实施例4的测定结果对比可知,聚乙烯亚胺作为氨基聚合物修饰到磁性微球表面,其能够偶联抗原的载量和偶联效率要高于聚酰胺。

[0648] 由实施例1与实施例5的测定结果对比可知,氨基聚合物的投料量过少,会影响氨基聚合物偶联磁球以及凝集素偶联氨基聚合物磁球的偶联效率降低,从而影响捕获分离效率。

[0649] 由实施例1与实施例6的测定结果对比可知,在活性保护液的保护下,凝集素偶联氨基聚合物磁球的活性能够得到良好地保障。

[0650] 由实施例1与实施例7的测定结果对比可知,扁豆凝集素特异性识别AFP-L3抗原的特异性要优于刀豆凝集素。

[0651] 由实施例1与对比例1-4的测定结果对比可知,若不对凝集素进行处理而直接偶联磁球,会对凝集素自身的活性或捕获效率造成一定的影响,而不采用氨基功能化的磁球偶联凝集素,偶联载量的下降也直接影响凝集素的捕获分离效率;磁球的活性保存液在一定程度上对凝集素的活性以及捕获分离效率上起到促进作用。

[0652] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用		
公开(公告)号	CN108333343A	公开(公告)日	2018-07-27
申请号	CN201710045387.6	申请日	2017-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 刘坤 袁锦云 刘来壮 李婷华 陈曙光		
发明人	饶微 刘坤 袁锦云 刘来壮 李婷华 陈曙光		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	赵囡囡		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫磁性复合物、其制备方法、包括其的抗原捕获剂、试剂盒、系统及应用。其中，该免疫磁性复合物包括：采用氨基聚合物修饰磁性微球得到的氨基功能化的磁性微球；凝集素，凝集素与氨基聚合物连接。应用本发明的技术方案，凝集素实际上是通过包被在磁性微球表面的氨基聚合物介导连接在磁性微球上，氨基聚合物包被磁性微球使得磁球表面修饰上大量氨基基团，该外层聚合物具有树枝网络状结构，能够充分提高偶联载量，同时降低空间位阻，并且使得目标偶联物凝集素远离磁性微球的刚性表面，最大程度地保证了目标偶联物的生物活性。

样本描述		实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	对比 例 1	对比 例 2	对比 例 3	对比 例 4
原发性肝癌样本 1	AFP-L3 确证含量 ng/mL	48.65										
	AFP-L3 测定含量 ng/mL	30.94	26.3	23.21	23.52	25.68	24.65	29.28	17.33	18.56	14.85	14.85
	捕获分离效率 %	63.6	54.1	47.7	48.3	52.8	50.7	60.1	35.6	38.2	30.5	30.5
原发性肝癌样本 2	AFP-L3 确证含量 ng/mL	168.3										
	AFP-L3 测定含量 ng/mL	118.81	91.89	82.69	84.6	91.51	81.63	116.23	61.14	64.87	53.43	54.98
	捕获分离效率 %	70.6	54.6	49.1	50.3	54.4	48.5	69.1	36.3	38.5	31.7	32.7
原发性肝癌样本 3	AFP-L3 确证含量 ng/mL	359.6										
	AFP-L3 测定含量 ng/mL	302.1	206.16	194.34	195.23	215.07	188.3	300.6	138.47	152.46	122.16	124.51
	捕获分离效率 %	84	57.3	54	54.3	59.8	52.4	83.6	38.5	42.4	34	34.6